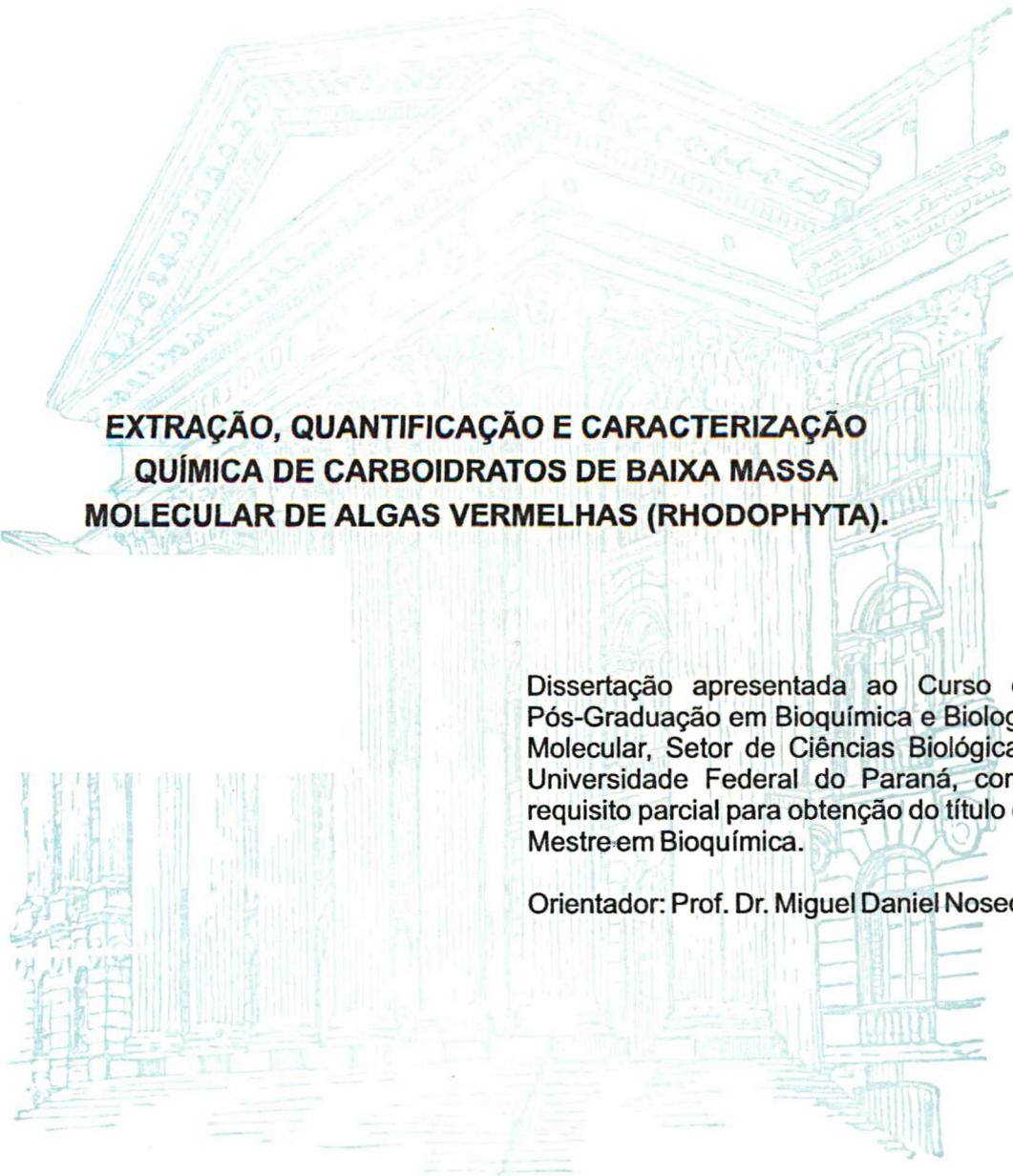


SÉRGIO DONIZETI ASCÊNCIO



**EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
QUÍMICA DE CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA  
MOLECULAR DE ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA).**

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2002

SÉRGIO DONIZETI ASCÊNCIO

**EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
QUÍMICA DE CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA  
MOLECULAR DE ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA).**

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

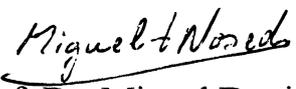
2002



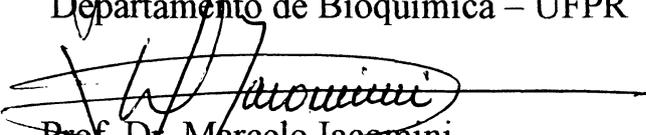
**Sérgio Donizeti Ascêncio**

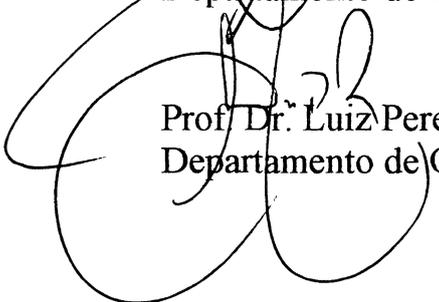
**EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CARBOIDRATOS DE  
BAIXA MASSA MOLECULAR DE ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA).**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências – Área Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pela seguinte banca examinadora:

  
Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosed  
Departamento de Bioquímica – UFPR

  
Prof. Dr.<sup>a</sup> Joana Lea Meira Silveira Ganter – UFPR  
Departamento de Bioquímica – UFPR

  
Prof. Dr. Marcelo Iacomini  
Departamento de Bioquímica – UFPR

  
Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos  
Departamento de Química – UFPR

Curitiba, 19 de fevereiro de 2002.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia R. Duarte

---

Dedico esta tese aos meus pais  
Salvador Valero Ascêncio e Rosa Hadas Ascêncio.

---

## **AGRADECIMENTOS**

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência, saúde e aptidão para desvendar os mistérios que a Ciência pode alcançar.

Agradeço ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá, pela orientação e companheirismo durante todos os momentos deste trabalho e principalmente pela amizade e compreensão durante o período em que não recebi auxílio financeiro. A Profa. Dra. Maria Eugênia R. Duarte, pela co-orientação, pelos conselhos e correções.

Agradeço especialmente aos meus pais, Salvador Valero Ascêncio e Rosa Hadas Ascêncio, pelo incentivo, força e compreensão que tiveram em todos os desafios que a vida me proporcionou. Vocês são meus exemplos de amor, honestidade, trabalho e respeito.

Ao meu grande amor, Poliana Guerino Marson, pelo apoio em todos os momentos desta etapa da minha vida. Pela maneira carinhosa que me recebia nos momentos difíceis e pela sua demonstração de força e coragem. Você faz parte da minha vida e desta conquista.

A minhas irmãs, Eliane e Viviane, e a minhas sobrinhas amadas, Anna Paula e Giovanna, obrigado pela descontração, conselhos, “brigas”, demonstrações de amor e afeto. Vocês são especiais.

Não poderia deixar de agradecer ao meu grande Mestre, Prof. Aluísio A. Marcondes, que me iniciou na pesquisa e com suas sábias palavras me incentivou a seguir os caminhos da Ciência.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, pela ajuda indispensável que prestou durante as análises por CLAE, pelo empréstimo de colunas e pela paciência e disposição no esclarecimento de muitas dúvidas, as quais após seus discursos, tornavam-se fidedignas. Obrigado Prof. Luiz.

A coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e seu corpo docente, pela contribuição e responsabilidade pela minha formação.

Agradeço aos amigos de laboratório, Rosiane, Adriano, menina Paula, Marcos, Alan, Gisele, Diogo, Flávia e Eduardo, pela ajuda e excelente convívio durante este período. Em especial ao Alexandre, por sua dedicação e perseverança nos experimentos em que me ajudou.

Aos amigos Fábio (Branco), Renato, Cesar, Lauro, Guilherme e Reis pela troca de informações na embriaguez, que nunca consegui me lembrar, e pela dor no estômago causada pelos cafés da cantina.

Ao Prof. Dr. José Maria de Souza, que consegue fazer da música uma Ciência e da humildade sua maior virtude. Permita-me chamar-lhe de meu amigo.

Aos meus irmãos de coração: Miotti (Fiscal); Moisés (Capa-preta); Marcos (Polonha); Ricardo (Titi), Carlão, obrigado pela amizade, companhia, cachaçadas, churrascadas, etc... Os momentos se vão, mas os verdadeiros amigos permanecem.

Aos amigos do Samba: Alexis (Duda); Evandro; Cleto (Buiú); Fernando (Chico Nandeis); Gil (Sorin); André (Betina); Giliarde (Gigi da Mangueira); Português; Marcelo (Paranga); Rogério (Fofão); Alessandro (Jaburú); Daniel (Cuco), Eduardo (Zelinho); Fabrício (Bi); Marron; Vilinha; Pavão; Indignado, etc... "Falei pra vocês que não sou mais disso..."

A minha avó Cecília Hadas, todo o meu respeito e admiração por suas demonstrações de amor, paciência, compreensão e fé. Obrigado pelos conselhos, preces e palavras de otimismo. Tu és a rosa que embeleza nosso jardim...

As bibliotecárias, em especial a Ruth e Mariza, por preservarem pela qualidade das normas empregadas neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas São José, em especial ao Dr. Júlio F. Gusso, por disponibilizar os equipamentos para as análises de sódio, potássio e cálcio.

Ao PRONEX-Carboidratos, projeto VITAE e a CAPES, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

|                                                                           |             |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                             | <b>iv</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>                                             | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>                                        | <b>ix</b>   |
| <b>RESUMO .....</b>                                                       | <b>xi</b>   |
| <br>                                                                      |             |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                 | <b>01</b>   |
| <br>                                                                      |             |
| 1.1 ALGAS: Aspectos gerais .....                                          | 01          |
| 1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS .....                                         | 02          |
| 1.2.1 A divisão Rhodophyta .....                                          | 03          |
| 1.3 CARBOIDRATOS DE ALGAS MARINHAS .....                                  | 04          |
| 1.3.1 Polissacarídeos de reserva .....                                    | 04          |
| 1.3.2 Carboidratos de Baixa Massa (CBMM) .....                            | 05          |
| <br>                                                                      |             |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                  | <b>12</b>   |
| <br>                                                                      |             |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....                                                  | 12          |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                           | 12          |
| <br>                                                                      |             |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                        | <b>13</b>   |
| <br>                                                                      |             |
| 3.1 MATERIAL DE TRABALHO .....                                            | 13          |
| 3.2 EXTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR .....              | 14          |
| 3.2.1 Extração etanólica qualitativa .....                                | 14          |
| 3.2.2 Extração etanólica quantitativa .....                               | 16          |
| 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS .....                                              | 18          |
| 3.3.1 Detecção de açúcares totais .....                                   | 18          |
| 3.3.2 Detecção de cloretos .....                                          | 18          |
| 3.3.3 Quantificação de sódio e potássio em espectrofotômetro de chama ... | 18          |
| 3.3.4 Dosagem de cálcio livre .....                                       | 19          |

|                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....                                                                                | 19        |
| 3.4.1 Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear monodimensionais .....                                                             | 20        |
| 3.4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C (RMN- <sup>13</sup> C) .....                                              | 20        |
| 3.4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C DEPT ( <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> ) ..... | 20        |
| 3.4.1.3 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN- <sup>1</sup> H) .....                                                        | 21        |
| 3.4.2 Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear bidimensionais .....                                                               | 21        |
| 3.4.2.1 COSY ( <i>Correlation Spectroscopy</i> ) .....                                                                             | 21        |
| 3.4.2.2 HMQC ( <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy</i> ) .....                                              | 22        |
| 3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....                                                                                                 | 22        |
| 3.5.1 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE) .....                                                          | 22        |
| 3.5.2. Cromatografia de Adsorção (carvão-Celite 1:1) .....                                                                         | 23        |
| 3.5.3 Cromatografia de Filtração em Gel .....                                                                                      | 23        |
| 3.5.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) .....                                                        | 24        |
| 3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA (ESI-MS - <i>eletrospray ionization – mass spectroscopy</i> ) .....                                    | 24        |
| 3.7 TRATAMENTO DO DIGENEASÍDEO COM RESINA CATIÔNICA (DOWEX 50-X8) .....                                                            | 25        |
| <br>                                                                                                                               |           |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                              | <b>26</b> |
| <br>                                                                                                                               |           |
| 4.1 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE FLORIDOSÍDEO OBTIDO DA ALGA <i>Acanthophora spicifera</i> .....   | 26        |
| 4.2 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE DIGENEASÍDEO OBTIDO DA ALGA <i>Bostrychia binderii</i> .....      | 39        |
| 4.2.1 RMN bidimensionais da molécula de Digeneasídeo .....                                                                         | 48        |
| 4.2.2 Perfil de eluição da fração BBP2-b em Cromatografia de Filtração em Gel (BIOGEL P-2) .....                                   | 52        |
| 4.3 PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES POR CLAE .....                                                                                       | 55        |
| 4.3.1 Curvas de calibração em CLAE para os heterosídeos Floridosídeo e Digeneasídeo .....                                          | 60        |

|          |                                                                                                                                                                                                             |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5</b> | <b>EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM DE TRÊS GRUPOS DE ALGAS VERMELHAS (Rhodophyta)</b> .....                                                                        | <b>63</b> |
| 5.1      | EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM EM ALGUMAS ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>Laurencia</i> (GRUPO A) .....                                                                   | 66        |
| 5.1.1    | Análises de RMN- <sup>13</sup> C e RMN- <sup>1</sup> H das algas pertencentes ao complexo <i>Laurencia</i> (GRUPO A) .....                                                                                  | 66        |
| 5.1.2    | Análises quantitativas dos CBMM das algas pertencentes ao complexo <i>Laurencia</i> (GRUPO A) .....                                                                                                         | 74        |
| 5.1.3    | Dosagem de cálcio livre, sódio e potássio (GRUPO A) .....                                                                                                                                                   | 80        |
| 5.2      | EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM EM <i>Acanthophora spicifera</i> E <i>Polysiphonia</i> sp., Rhodophyta, Ceramiales (GRUPO B) .....                                 | 82        |
| 5.2.1    | Análises de RMN- <sup>13</sup> C e RMN- <sup>1</sup> H das algas <i>Acanthophora spicifera</i> e <i>Polysiphonia</i> sp, Ceramiales (GRUPO B) .....                                                         | 82        |
| 5.2.2    | Análise quantitativa dos CBMM das algas <i>Acanthophora spicifera</i> e <i>Polysiphonia</i> sp., Ceramiales (GRUPO B) .....                                                                                 | 85        |
| 5.2.3    | Dosagem de cálcio livre, sódio e potássio (GRUPO B) .....                                                                                                                                                   | 87        |
| 5.3      | EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM EM <i>Gracilaria cervicornis</i> Rhodophyta: Gracilariales E <i>Tricleocarpa cylindrica</i> Rhodophyta: Nemaliales (GRUPO C) ..... | 88        |
| 5.3.1    | Análises de RMN- <sup>13</sup> C e RMN- <sup>1</sup> H das algas <i>Gracilaria cervicornis</i> e <i>Tricleocarpa cylindrica</i> (GRUPO C) .....                                                             | 88        |
| 5.3.2    | Análise quantitativa dos CBMM das algas <i>Gracilaria cervicornis</i> e <i>Tricleocarpa cylindrica</i> (GRUPO C) .....                                                                                      | 91        |
| 5.3.3    | Dosagem de cálcio livre, sódio e potássio (GRUPO C) .....                                                                                                                                                   | 93        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....                                                                                                                                                                                     | <b>95</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                                                                                                                                                     | <b>97</b> |

## **LISTA DE FIGURAS**

---

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1: ESTRUTURA QUÍMICA DOS HETEROSÍDEOS PRESENTES NAS ALGAS VERMELHAS (DIVISÃO RHODOPHYTA) .....                                                                                     | 6  |
| FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA APRESENTADA PELOS POLIALCOOIS ENCONTRADOS EM DIFERENTES GRUPOS DE ALGAS VERMELHAS .....                                                                       | 7  |
| FIGURA 3: ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C OBTIDO DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>Acanthophora spicifera</i> .....                                                                        | 28 |
| FIGURA 4: CROMATOGRAMA DA ANÁLISE POR CLAE DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>Acanthophora spicifera</i> .....                                                                               | 29 |
| FIGURA 5: PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Acanthophora spicifera</i> .....                                               | 31 |
| FIGURA 6: ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DO ELUATO AQUOSO OBTIDO DA ALGA <i>Acanthophora spicifera</i> POR CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) .....                       | 31 |
| FIGURA 7: ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DO ELUATO ETANÓLICO (ETOH 25%) OBTIDO DA ALGA <i>Acanthophora spicifera</i> APÓS CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) .....        | 32 |
| FIGURA 8: ANÁLISE POR CLAE DO ELUATO ETANÓLICO (ETOH 25%) OBTIDO DA EXTRAÇÃO QUALITATIVA DA ALGA <i>Acanthophora spicifera</i> POR CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) ..... | 33 |
| FIGURA 9: ESPECTRO DE MASSA OBTIDO POR CG-EM DA FRAÇÃO PF <sub>c</sub> ACETILADA .....                                                                                                    | 34 |
| FIGURA 10: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DE PADRÕES DE MONOSSACARÍDEOS (HEXOSES E PENTOSES) E ALDITOIS .....                                                                               | 36 |
| FIGURA 11: SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE DAS FRAÇÕES PF <sub>c</sub> E PF <sub>c</sub> HIDROLISADA .....                                                                | 37 |
| FIGURA 12: ESPECTRO DE ESI-MS DA FRAÇÃO PF .....                                                                                                                                          | 38 |
| FIGURA 13: ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DO EXTRATO METANÓLICO DA ALGA <i>Bostrycia binderii</i> .....                                                                                 | 40 |

|                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 14: ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO BB-A12 OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) DO EXTRATO METANÓLICO DA ALGA <i>Bostrychia binderii</i> .....                            | 41 |
| FIGURA 15: ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (DEPT-135) DO ELUATO AQUOSO (FRAÇÃO BB-A12) OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) DO EXTRATO METANÓLICO DA ALGA <i>Bostrychia binderii</i> ..... | 41 |
| FIGURA 16: PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO EM BIOGEL-P2 DA FRAÇÃO BB-A12 .....                                                                                                                      | 42 |
| FIGURA 17: ANÁLISE POR CLAE DAS SUBFRAÇÕES CORRESPONDENTE AO PICO PRINCIPAL ELUIDO EM BIOGEL P-2 DA FRAÇÃO BB-A12 (I= TUBOS 6 E 8; II= TUBOS 10, 12 E 16; III= TUBO 18) .....                                      | 43 |
| FIGURA 18: ANÁLISE POR CLAE DA FRAÇÃO BBP2-b E DE SEUS PRODUTOS DE HIDRÓLISE .....                                                                                                                                 | 44 |
| FIGURA 19: ESPECTRO DE MASSA DA FRAÇÃO BBP2-B OBTIDO POR ESI-EM .....                                                                                                                                              | 45 |
| FIGURA 20: ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO BBP2-b TRATADA COM RESINA CATIÔNICA NA FORMA DE SÓDIO (BBP2-bNa) .....                                                                                       | 46 |
| FIGURA 21: ANÁLISE POR CLAE DAS FRAÇÕES BBP2-bNa E BBP2-b .....                                                                                                                                                    | 47 |
| FIGURA 22: ESPECTRO DE HMQC DA FRAÇÃO BBP2-bNa (TRATADA COM RESINA CATIÔNICA NA FORMA DE SÓDIO) .....                                                                                                              | 49 |
| FIGURA 23: ESPECTRO DE COSY DA FRAÇÃO BBP2-bNa (TRATADA COM RESINA CATIÔNICA NA FORMA DE SÓDIO) .....                                                                                                              | 50 |
| FIGURA 24: PERFIL DE ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL (BIOGEL P-2) DA FRAÇÃO BBP-2b UTILIZANDO ELUENTE (H <sub>2</sub> O) EM DIFERENTES pH .....                                                       | 54 |
| FIGURA 25: ESQUEMA DE UM DETECTOR REFRAATOMÉTRICO DO TIPO FRESNEL .....                                                                                                                                            | 58 |

|                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 26: ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICIÊNCIA CROMATOGRÁFICA ENTRE AS COLUNAS REZEX RPM-MONOSACCHARIDE E HPX-87H, PARA A SEPARAÇÃO DOS HETEROSÍDEOS FLORIDOSÍDEO E DIGENEASÍDEO NO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>Acanthophora spicifera</i> ..... | 59 |
| FIGURA 27: CURVA DE CALIBRAÇÃO EM CLAE PARA FLORIDOSÍDEO.....                                                                                                                                                                                   | 60 |
| FIGURA 28: CURVA DE CALIBRAÇÃO EM CLAE PARA DIGENEASÍDEO .....                                                                                                                                                                                  | 61 |
| FIGURA 29: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E <sup>1</sup> H (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>L. furcata</i> .....                                                                                                                      | 68 |
| FIGURA 30: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E <sup>1</sup> H (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>C. flagellifera</i> .....                                                                                                                 | 69 |
| FIGURA 31: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E <sup>1</sup> H (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>L. clavata</i> .....                                                                                                                      | 70 |
| FIGURA 32: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E <sup>1</sup> H (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>L. filiformis</i> .....                                                                                                                   | 71 |
| FIGURA 33: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E <sup>1</sup> H (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>C. trasnslucida</i> .....                                                                                                                 | 72 |
| FIGURA 34: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E <sup>1</sup> H (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>L. arbuscula</i> .....                                                                                                                    | 73 |
| FIGURA 35: CROMATOGRAMAS OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DAS ALGAS <i>L. arbuscula</i> (A); <i>L. clavata</i> (B) e <i>L. filiformis</i> (C) .....                                                                                     | 76 |
| FIGURA 36: CROMATOGRAMAS OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DAS ALGAS <i>Laurencia furcata</i> (A); <i>Chondrophyucus translucida</i> (B) e <i>C. flagellifera</i> (C) .....                                                              | 77 |
| FIGURA 37: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E DE <sup>1</sup> H (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>Acanthophora spicifera</i> .....                                                                                                       | 83 |
| FIGURA 38: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E DE <sup>1</sup> H (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA <i>Polysiphonia sp.</i> .....                                                                                                             | 84 |
| FIGURA 39: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DA ALGA <i>A. spicifera</i> .....                                                                                                                                              | 86 |
| FIGURA 40: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DA ALGA <i>Polysiphonia sp.</i> .....                                                                                                                                          | 86 |

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 41: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E DE <sup>1</sup> H (B) DA EXTRAÇÃO ETANÓLICA QUALITATIVA DA ALGA <i>T. cylindrica</i> ..... | 89 |
| FIGURA 42: ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (A) E <sup>1</sup> H (B) DA EXTRAÇÃO ETANÓLICA QUALITATIVA DA ALGA <i>G. cervicornis</i> .....   | 90 |
| FIGURA 43: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DA ALGA <i>G. cervicornis</i> .....                                          | 92 |
| FIGURA 44: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DA ALGA <i>T. cylindrica</i> .....                                           | 92 |

## **LISTA DE TABELAS**

---

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS QUE SÃO OBJETOS DE ESTUDO DESTE TRABALHO .....                                                                          | 13 |
| TABELA 2: ASSINALAMENTOS NO ESPECTRO DE RMN $^{-13}\text{C}$ PARA FLORIDOSÍDEO E DIGENEASÍDEO SEGUNDO KARSTEM et al. (1999) .....                         | 27 |
| TABELA 3: ASSINALAMENTOS NO ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$ DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Acanthophora spicifera</i> .....                                  | 27 |
| TABELA 4: ASSINALAMENTO DE RMN- $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DO DIGENEASÍDEO (FRAÇÃO BBP2-bNa) .....                                                    | 51 |
| TABELA 5: RESULTADOS DAS ANÁLISES POR RMN- $^{13}\text{C}$ , RMN- $^1\text{H}$ E CLAE DAS ALGAS PERTENCENTES AO COMPLEXO <i>Laurencia</i> (GRUPO A) ..... | 75 |
| TABELA 6: CONCENTRAÇÃO DE ÍONS NAS ALGAS PERTENCENTES AO COMPLEXO <i>Laurencia</i> (GRUPO A) .....                                                        | 81 |
| TABELA 7: TABELA DE CONCENTRAÇÃO DE ÍONS NAS ALGAS <i>A. spicifera</i> e <i>Polysiphonia</i> sp. ....                                                     | 87 |
| TABELA 8: CONCENTRAÇÃO DE $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ E $\text{Ca}^{2+}$ NAS ALGAS <i>T. cylindrica</i> E <i>G. cervicornis</i> .....                    | 95 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BB-A1:** fração obtida pela eluição aquosa do extrato metanólico da alga *B. binderii* em cromatografia de adsorção carvão-Celite, apresentando reação positiva para cloretos;

**BB-A12:** união das frações BB-A1 e BB-A2;

**BB-A2:** fração obtida pela eluição aquosa do extrato metanólico da alga *B. binderii* em cromatografia de adsorção carvão-Celite, apresentando reação negativa para cloretos;

**BBP2-a:** união do conteúdo dos tubos 6 a 9 da cromatografia de exclusão em BioGel P2;

**BBP2-b:** união do conteúdo dos tubos 10 a 17 da cromatografia de exclusão em BioGel P2;

**BBP2-bH:** alíquota da fração BBP2-b submetida a hidrólise com TFA 1 M por 4 h;

**BBP2-bNa:** fração BBP2-b tratada com resina catiônica na forma de sal de sódio;

**BBP2-c:** união do conteúdo dos tubos 18 a 19 da cromatografia de exclusão em BioGel P2;

**CBMM:** carboidratos de baixa massa molecular;

**CG:** cromatografia gasosa;

**CG-EM:** cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;

**CLAE:** cromatografia líquida de alta performance;

**COSY:** correlation spectroscopy;

**d.i.:** diâmetro interno;

**D<sub>2</sub>O:** óxido de deutério;

**DEPT:** distortionless enhancement by polarization;

**EDTA:** ácido dietilamino tetra acético;

**EM:** espectrometria de massa;

**ESI-MS:** *Eletrospray Ionization – Mass Spectroscopy*

**ETOH 70%:** solução de etanol 70% em água;

**ETOH 75%:** solução de etanol 75% em água;

**H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** bicarbonato marcado com carbono-14;

**H<sub>2</sub>O mQ:** água ultra purificada;

**HMQC:** *heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*;

**J:** constante de acoplamento

**m/z:** razão entre a massa molecular e a carga da molécula;

**MeOH 75%:** solução de metanol 75% em água;

**NaOH:** hidróxido de sódio;

**ppm:** parte por milhão;

**RID:** refratômetro de índice de refração;

**RMN:** ressonância magnética nuclear;

**RMN-<sup>13</sup>C:** ressonância magnética nuclear de carbono-13;

**RMN-<sup>1</sup>H:** ressonância magnética nuclear de próton;

**TFA:** ácido trifluoracético;

**Tr:** tempo de retenção em minutos;

**V<sub>0</sub>:** volume morto;

**V<sub>t</sub>:** volume total.

**RESUMO**

---

## RESUMO

No presente trabalho foram extraídos, identificados e quantificados os carboidratos de baixa massa molecular (CBMM) de 10 espécies de algas vermelhas (Rhodophyta). Os CBMM foram extraídos com etanol (70%) a 70 °C por 3 horas e analisados por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , CLAE, CG-EM e ESI-MS. A quantificação foi realizada por CLAE utilizando uma coluna de estireno divinilbenzeno na forma hidrogeniônica (HPX 87-H), a qual foi capaz de separar os heterosídeos digeneasídeo [ $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato] e floridosídeo [ $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-glicerol]. De *Acanthophora spicifera* e *Bostrychia binderii*, ambas pertencentes a ordem Ceramiales, foram extraídos e purificados seqüencialmente por cromatografia de Adsorção (carvão-Celite) e filtração em Gel (BioGel P-2) os heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, respectivamente. As estruturas químicas foram confirmadas por RMN 1D e 2D, CLAE, ESI-MS e CG-EM. Estes heterosídeos foram utilizados como padrões, desde que estes compostos não estão disponíveis comercialmente. Foram realizadas curvas de calibração em CLAE para cada um dos heterosídeos utilizando detector de índice refratométrico (RID). Os resultados das análises de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , e CLAE demonstraram que as espécies: *Acanthophora spicifera*; *Chondrophyucus flagellifera*; *C. translucida*; *Laurencia arbuscula*; *L. clavata*; *L. filiformis*; *L. furcata*; *Polysiphonia* sp., pertencentes a ordem Ceramiales, e *Gracilaria cervicornis*, ordem Gracilariales; *Tricleocarpa cylindrica*, ordem Nemaliales, biossintetizam tanto floridosídeo quanto digeneasídeo, sendo a primeira vez que foi descrita a presença de ambos heterosídeos (floridosídeo e digeneasídeo) na mesma planta. Foram verificadas diferenças nas concentrações destes heterosídeos, com grande variação da relação floridosídeo/digeneasídeo, não sendo possível estabelecer relação entre a concentração de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) e a dos CBMM nas espécies estudadas. Assim sendo, o heterosídeo digeneasídeo não é um produto fotossintético exclusivo de espécies de algas pertencentes à ordem Ceramiales, e portanto sua presença ou ausência não pode ser considerada como caracter quimiotaxonômico desta ordem. Estes resultados demonstram a necessidade da utilização de técnicas de alta sensibilidade para a correta caracterização dos CBMM sintetizados pelas algas vermelhas, o que tem consequência direta na possível utilização destes carboidratos como marcadores quimiotaxonômicos.

## **INTRODUÇÃO**

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ALGAS: Aspectos gerais

Pertencentes ao reino vegetal, as algas compreendem um grupo muito diverso de organismos fotossintetizadores e não vasculares, com estruturas reprodutivas desprotegidas (Cryptogâmia), produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (SOUTH; WHITTICK, 1987).

Por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas, as algas são classificadas como talófitas, isto é, plantas ditas inferiores. Podem ser procarióticas a eucarióticas, unicelulares a pluricelulares, apresentando-se na forma de agregados, filamentos ou talos parenquimatosos. Mesmo estas formas multicelulares mostram baixo nível de diferenciação celular quando comparadas com outros grupos de plantas, e apenas as espécies mais evoluídas apresentam tecidos condutores elementares (VAN DEN HOEK et al., 1989).

Por outro lado, a variação morfológica é extremamente diversa, sendo que em algumas espécies de algas pardas podemos encontrar organismos com dezenas de metros. Esta variabilidade também se estende aos seus mecanismos de reprodução, onde estão envolvidos processos vegetativos, sexuais e assexuais e em muitas formas pode ocorrer alternância de gerações. Tão grande é a variabilidade dos processos reprodutivos das algas, que a reprodução sexual na divisão Rhodophyta pode ser considerada como a mais complexa do reino vegetal. Existem ainda, muitas formas unicelulares que apresentam motilidade, podendo ser confundidas com protozoários (SOUTH; WHITTICK, 1987).

Do ponto de vista bioquímico e fisiológico, as algas apresentam similaridade em muitos aspectos comuns às plantas superiores. Todas possuem clorofila "A" como principal pigmento fotossintético e possuem as mesmas vias bioquímicas básicas. Outros tipos de clorofila apresentam uma distribuição mais limitada, funcionando como pigmentos acessórios, bem como os carotenóides ( $\beta$ -caroteno e fucoxantina), a ficocianina e a ficoeritrina. Também seus carboidratos de reserva e

proteínas biossintetizadas apresentam similaridade aos das plantas superiores (SOUTH; WHITTICK, 1987).

As algas apresentam uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente todas as condições ambientais da Terra, desde solos férteis até desertos quentes e frios, e em todos os tipos de ambientes aquáticos. Nesses, são mais abundantes e representam as maiores fontes de compostos orgânicos, desempenhando um papel central na base da cadeia alimentar e ainda servindo como fonte de oxigênio, necessário para o metabolismo dos consumidores (LEE, 1989).

Algumas algas pertencentes às divisões Rhodophyta e Phaeophyta (vermelhas e pardas, respectivamente) podem ser utilizadas na indústria como fonte de alimento humano ou de extratos químicos, que são amplamente utilizados na manufatura de alimentos e muitos outros produtos. Também podem representar organismos problema em sistemas de abastecimento de água e em fontes sujeitas a eutrofização, além de algumas espécies oferecerem riscos de envenenamento, como as Dinophyta, responsáveis pela maré-vermelha (SOUTH; WHITTICK, 1987).

O valor nutritivo das algas utilizadas na dieta humana está relacionado apenas aos carboidratos solúveis, uma vez que os carboidratos estruturais (constituintes da parede celular) não são digeridos pelo homem (SOUTH; WHITTICK, 1987). Por outro lado, representam excelentes fontes de vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>12</sub>, C, D e E, sendo que a concentração de vitamina C é considerada equivalente a dos frutos cítricos, além de fornecerem todos os elementos traços requeridos para a nutrição humana (SOUTH; WHITTICK, 1987).

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS

Os pigmentos fotossintéticos são utilizados como critérios primários para a classificação das algas, seguido de uma série de outros fatores mais específicos como morfologia, ciclo de vida, natureza química dos produtos de reserva e composição da parede celular, além de estudos citológicos como estrutura fina de organelas como flagelo, núcleo e cloroplastos. Desta forma, são reconhecidas 6

divisões, cujos nomes freqüentemente fazem referência à cor dos pigmentos nelas incluídos. Duas delas são procarióticas e compreendem as divisões das Cyanophyta e Prochlorophyta, seguidas de quatro divisões eucarióticas: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas marrons ou pardas), Chlorophyta (algas verdes) e Euglenophyta (RAVEN et al., 1996; SOUTH; WHITTICK, 1987; VAN DEN HOEK et al., 1989).

### 1.2.1 A divisão Rhodophyta

A divisão Rhodophyta representa um dos mais antigos grupos de algas eucarióticas, apresentando apenas uma única classe, Rhodophyceae, que se divide em duas subclasses, Bangioideae e Florideae. Esta divisão engloba mais de 6000 espécies, distribuídas em aproximadamente 600 gêneros, sendo que destes, cerca de 20 são representantes de água doce e 10 são unicelulares. Os demais gêneros até agora conhecidos são representados unicamente por organismos pluricelulares de ambiente marinho (LEE, 1989; VAN DEN HOEK et al., 1989).

A grande maioria das algas marinhas pertence à divisão Rhodophyta, existindo mais algas vermelhas do que todos os outros grupos de algas marinhas combinados. Ainda assim, trata-se de uma divisão pequena quando comparada às plantas superiores, uma vez que Compositae, uma família de dicotiledôneas, tem cerca de 900 gêneros e 20.000 espécies (RAVEN et al., 1996; VAN DEN HOEK et al., 1989).

O habitat dessas macroalgas também é muito diverso, podendo se desenvolver fixadas a rochas, sobre substratos calcários, paredes oceânicas ou ainda sobre conchas de moluscos ou sobre outras algas (RAVEN et al., 1996; VAN DEN HOEK et al., 1989). São mais abundantes em regiões quentes, próximas a linha do equador, onde apresentam tamanho reduzido. Podem se estender até águas mais frias, onde atingem maiores proporções, porém, existindo poucas espécies em regiões polares e sub-polares, onde as divisões Phaeophyta e Chlorophyta são mais abundantes (VAN DEN HOEK et al., 1989; LEE, 1989).

A coloração predominante (avermelhada) é devido à presença do pigmento acessório fotossintético denominado ficoeritrina, o qual se acumula no interior dos cloroplastos. Também podem se apresentar violeta, marrom ou azul, sendo estas variações de coloração atribuídas a outros pigmentos acessórios que também são encontrados nestas algas, como ficocianina e aloficocianina. Plantas que se desenvolvem em regiões mais superficiais são predominantemente azul-violeta, uma vez que apresentam uma maior quantidade de ficocianina, enquanto que plantas de regiões mais profundas são vermelho-escuras por possuírem maior quantidade de ficoeritrina (VAN DEN HOEK et al., 1989; SOUTH; WHITTICK, 1987). Em regiões com incidência direta de luz, as algas podem ainda apresentar coloração amarelo-marrom ou até mesmo verde, pois a clorofila "A" e os carotenóides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina) mascaram as ficobiliproteínas, que são pigmentos acessórios associados a proteínas (ficocianina e aloficocianina). Quando morrem, as algas vermelhas tendem a se tornar verdes, uma vez que, ao contrário da clorofila, as ficobiliproteínas são solúveis em água e, portanto, são perdidas (VAN DEN HOEK et al., 1987).

Algumas ordens de Rhodophyta, como Cryptonemiales, Nemaliales e Gigartinales, apresentam ainda calcificação da parede celular, um processo relacionado com as vias de fixação do carbono, onde íons carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) se combinam com íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) resultando no depósito de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ao redor da célula ou no meio intracelular (SOUTH; WHITTICK, 1987).

### 1.3 CARBOIDRATOS DE ALGAS MARINHAS

#### 1.3.1 Polissacarídeos de reserva

As algas biossintetizam uma grande variedade de compostos citoplasmáticos com função de armazenagem, os quais podem apresentar alta ou baixa massa molecular.

Os verdadeiros compostos de reserva biossintetizados pelas algas são polímeros de glucose, relativamente insolúveis. Em Chlorophyta encontra-se um

típico amido, como o das plantas superiores, constituído de uma cadeia linear  $\alpha$ -(1→4) (amilose) e uma cadeia ramificada  $\alpha$ -(1→4) e  $\alpha$ -(1→6) (amilopectina), armazenados na forma de grãos dentro dos cloroplastos. Em Rhodophyta encontra-se o chamado amido das florídeas, uma glucana similar à amilopectina, armazenada na forma de grãos citoplasmáticos, enquanto que em Phaeophyta encontra-se uma poliglucana  $\beta$ -(1→3) denominada de laminarana, que pode apresentar unidades terminais de manitol e algumas ramificações do tipo (1→6) (LEE, 1989; SOUTH; WHITTICK, 1987).

### 1.3.2 Carboidratos de Baixa Massa Molecular (CBMM)

As macroalgas biossintetizam, além de polissacarídeos de reserva, carboidratos de baixa massa molecular (CBMM) (heterosídeos, sacarose e polióis), os quais em muitos casos podem representar os principais produtos fotossintéticos desses organismos (KARSTEN et al., 1999).

Os principais heterosídeos encontrados em macroalgas são compostos formados a partir de galactose e glicerol [ $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1→2)-glicerol], denominado de floridosídeo, e seus isômeros de posição [ $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1→1)-D-glicerol] e [ $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1→1)-L-glicerol], denominados de D-isofloridosídeo e L-isofloridosídeo, respectivamente (KARSTEN et al., 1993) (FIGURA 1). Além desses heterosídeos, ainda pode ser encontrado o heterosídeo formado por manose e ácido glicérico [ $\alpha$ -D-manopiranosil-(1→2)-D-glicerato], denominado de digeneasídeo (FIGURA 1) (BOUVENG, et al., 1955; KREMER; VOLG, 1975; KARSTEN, 1999).

Os polióis são formados a partir de unidades monossacarídicas reduzidas, constituindo dessa maneira poliálcoois de D-manose, D-glucose e D-galactose (D-manitol, D-sorbitol e dulcitol, respectivamente) (FIGURA 2). Estes compostos são considerados como principais responsáveis pela manutenção das pressões osmótica

e de turgor, embora este mecanismo ainda não esteja bem esclarecido (CROWE et al., 1987).

As algas vermelhas (Divisão Rhodophyta) biossintetizam floridosídeo, isofloridosídeos, digeneasídeo e polióis (sorbitol e dulcitol) enquanto que as algas verdes (Divisão Chlorophyta) e pardas (Divisão Phaeophyta) produzem principalmente sacarose e manitol, respectivamente (KARSTEN et al., 1991).

Os CBMM possuem atividade osmorreguladora, funcionando como osmólitos ou solutos compatíveis, tendo efeito estabilizante em enzimas, membranas e em estruturas de macromoléculas sob condições de hipersalinidade, mostrando-se acumulados no citoplasma celular (KIRST, 1980b; KARSTEN et al., 1999).

FIGURA 1: ESTRUTURA QUÍMICA DOS HETEROSÍDEOS PRESENTES NAS ALGAS VERMELHAS (DIVISÃO RHODOPHYTA).

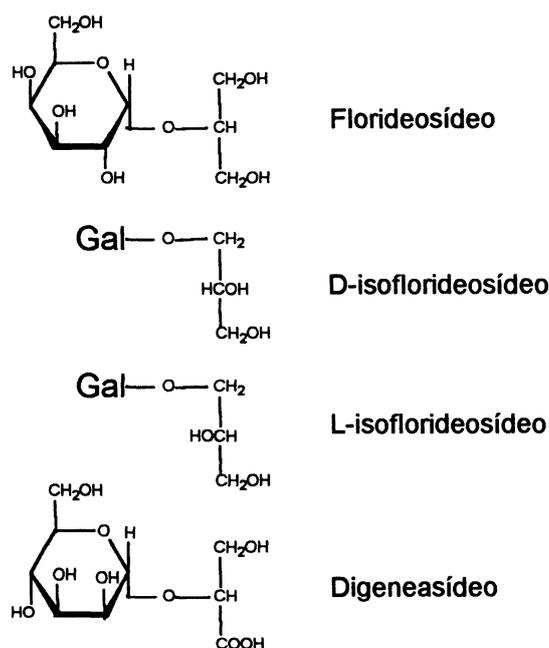
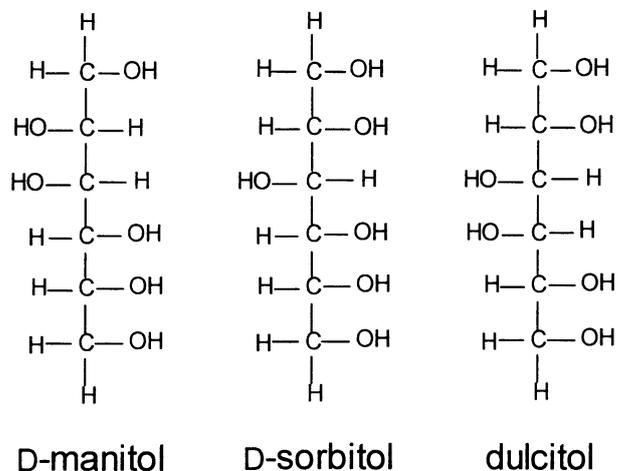


FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA APRESENTADA PELOS POLIALCOOIS ENCONTRADOS EM DIFERENTES GRUPOS DE ALGAS VERMELHAS.



Os primeiros relatos do heterosídeo  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato datam de 1939, e foram descritos por COLIN; AUGIER (1939). Estes autores isolaram este glicosídeo da alga vermelha *Polysiphonia fastigiata* e assumiram que a ligação glicosídica se dava no carbono 2 do ácido glicérico, embora não tenham oferecido nenhuma evidência experimental para tal estrutura. AUGIER (1954), investigou um grande número de algas vermelhas e encontrou esta mesma estrutura em várias espécies estudadas.

A primeira evidência experimental da estrutura química deste composto foi descrita por BOUVENG et al. (1955), a qual foi elucidada por técnicas de metilação. O material analisado foi obtido da alga vermelha *Ceramium rubrum* e encontrava-se na forma de sal de sódio. O glicosídeo foi então submetido à metilação com metilsulfato e hidróxido de sódio. Posteriormente, o material metilado foi tratado com diazometano para esterificação do grupamento carboxílico. O éster formado foi então reduzido com hidreto de alumínio/lítio. O produto reduzido foi submetido a hidrólise e analisado por cromatografia em papel. Foram utilizados como padrões 1-O-metil glicerol, 2-O-metil glicerol e 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manose. Os resultados

desta cromatografia mostraram duas manchas com valores de Rf (distância percorrida pela amostra) e coloração idêntica ao primeiro e terceiro padrão. A presença do 1-O-metil glicerol e a ausência de 2-O-metil glicerol foi a primeira evidência de que a ligação glicosídica deste composto se dava no carbono 2 do ácido glicérico. Novos passos reacionais foram realizados com o material reduzido, obtendo-se como produtos de hidrólise 1,3-di-O-metil glicerol e 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manose, confirmando então a estrutura química proposta (BOUVENG et al., 1955).

WHYTE (1969) também relata a presença de  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato em *Rhodomela larix*, utilizando para sua identificação técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H) e espectrometria de massa (EM).

KREMER; VOLG (1975) estudando os produtos fotossintéticos de várias espécies de Rhodophyta, pela técnica de incorporação de <sup>14</sup>C (utilizando H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) através da fotossíntese, detectaram a presença do composto  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato somente em espécies da ordem Ceramiales, passando a tratar tal composto pelo nome usual digeneasídeo, e sugerindo ainda seu uso na classificação quimiotaxonômica das espécies pertencentes àquela ordem.

O heterosídeo floridosídeo foi isolado e descrito pela primeira vez em 1930 (COLIN; GUÉGUEM, 1930) e, após sua descoberta, tem sido relatado em várias espécies de algas vermelhas. Este carboidrato é considerado como principal produto fotossintético e de reserva de todas as ordens de Rhodophyta, exceto para ordem Ceramiales, onde, em geral, os membros desta ordem sintetizam e acumulam o heterosídeo digeneasídeo (KREMER; VOLG, 1975; KIRST, 1980a).

Devido a diferenças na distribuição dos CBMM entre as espécies de algas vermelhas, estes passaram a ser considerados úteis como critério taxonômico e filogenético, quando associado a outros caracteres, tais como: morfologia, genética, ultraestrutura, desenvolvimento e ciclo de vida (KREMER; VOLG, 1975; KIRST, 1980a; KARSTEN et al., 1993; KARSTEN et al., 1999).

Em geral, para que um componente orgânico seja útil como marcador em sistemática, é necessário que este seja específico de um certo taxon ou grupo de organismos e que seja suficientemente abundante para ser detectado e identificado com segurança (KARSTEN et al., 1991). Desta maneira, os carboidratos de baixa massa molecular sintetizados durante a fotossíntese por diferentes espécies de

algas têm sido considerados como promissores marcadores quimiotaxonômicos (KIRST, 1980a).

Apesar destas considerações sobre os heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, tem-se demonstrado que alguns gêneros da ordem Ceramiales (*Laurencia* e gêneros relacionados) produzem e acumulam floridosídeo e não digeneasídeo (BARROW et al., 1995). Outras exceções bioquímicas são relatadas em Bostrychioideae (Ceramiales, Rhodomelaceae), taxon caracterizado por sintetizar os poliálcoois sorbitol e dulcitol, componentes não muito comuns em algas vermelhas do gênero *Caloglossa* (Ceramiales, Delesseriaceae), onde o principal carboidrato de baixa massa molecular sintetizado é o manitol (KARSTEN et al., 1992; KARSTEN et al., 1993; KARSTEN, 1999). Esse alditol é considerado como marcador quimiotaxonômico de algas pardas (KREMER, 1976).

O interesse no papel destes solutos orgânicos como marcadores quimiotaxonômicos e na adaptação osmótica de macroalgas pertencentes à divisão Rhodophyta, tem levado à utilização de várias técnicas analíticas para caracterização e quantificação desses componentes (WHYTE, 1969; KARSTEN et al., 1991; KARSTEN et al., 1994; KARSTEN et al., 1999).

Os CBMM têm sido estudados por métodos químicos clássicos (KREMER; VOLG, 1975) e mais recentemente vêm sendo estudados através de métodos cromatográficos de alta resolução, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), além de técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (KARSTEN et al., 1991; KARSTEN et al., 1993; DUARTE et al., 1997; KARSTEN et al., 1999).

As técnicas de RMN permitem uma rápida elucidação da estrutura química destes compostos, bem como a determinação de suas percentagens relativas nas algas (KARSTEN et al., 1993; KARSTEN et al., 1994). Já as técnicas de CLAE e CG-EM permitem quantificar facilmente estes componentes, apresentando cada uma delas vantagens e desvantagens durante sua execução. As análises por GC-EM consomem considerável tempo devido aos processos de derivatização das amostras para torná-las voláteis. Além disso, o uso de solventes e produtos químicos de alto poder carcinogênico, nas etapas de derivatização, necessitam de um cuidado especial no manuseio e descarte dos meios de reação (KARSTEN et al., 1991).

As análises por CLAE permitem uma análise rápida e sensível dos carboidratos de baixa massa molecular, com a vantagem de não necessitar de derivatização da amostra, além de utilizar como fase móvel H<sub>2</sub>O destilada, que tem um custo relativamente baixo quando comparado com outros solventes e não necessita de cuidados especiais no seu descarte (KARSTEN et al., 1991).

Uma cuidadosa revisão bibliográfica foi realizada sobre os estudos relacionados com os CBMM publicados até o momento, visando compreender sua importância como produto fotossintético e como marcador quimiotaxonômico em algas vermelhas pertencentes à divisão Rhodophyta. Essa busca na literatura revelou uma constante contradição de resultados, principalmente no que diz respeito à utilização do heterosídeo digeneasídeo como marcador quimiotaxonômico de espécies pertencentes a ordem Ceramiales. Notou-se também uma grande variação nas técnicas analíticas utilizadas que nem sempre podem ser comparadas diretamente.

KREMER; VOLG (1975); KREMER (1976) e KIRST (1980a), sugerem que o heterosídeo digeneasídeo seja considerado como marcador quimiotaxonômico de espécies de algas pertencentes a ordem Ceramiales. Estes autores utilizaram para caracterização e quantificação desses heterosídeos métodos químicos e enzimáticos clássicos, baseados na hidrólise desses compostos e posterior dosagem do ácido glicérico liberado por oxidação a ácido hidroxipirúvico pela enzima ácido glicérico desidrogenase e coenzima NAD<sup>+</sup>.

COURT (1980), investigando as propriedades fotossintéticas de duas algas pertencentes à ordem Ceramiales, acompanhou a incorporação de <sup>14</sup>C em vários compostos fotossintéticos, incluindo floridosídeo e isofloridosídeos. Entretanto, não foi encontrada nenhuma evidência que indicasse a presença do heterosídeo digeneasídeo, tanto para os compostos marcados como para os compostos não marcados.

BARROW et al. (1995), utilizando técnicas de RMN-<sup>13</sup>C e CG, analisaram os CBMM de 27 espécies de algas vermelhas pertencentes à ordem Ceramiales (*Laurencia* e gêneros relacionados) e relataram a ausência do heterosídeo digeneasídeo em todas as espécies investigadas, encontrando apenas o floridosídeo.

Deste modo, resultados contraditórios obtidos por diferentes grupos de pesquisa mereceram ser reavaliados neste trabalho, utilizando-se a associação de técnicas analíticas de alta sensibilidade, para que se possa determinar se os heterosídeos (floridosídeo e digeneasídeo) apresentam ou não valor quimiotaxonômico.

Deve-se ainda ressaltar que o presente trabalho é pioneiro em relação ao estudo dos carboidratos de baixa massa molecular, realizado no Laboratório de Química de Carboidratos de Macroalgas Marinhas do Departamento de Bioquímica desta Universidade, uma vez que, os trabalhos realizados anteriormente eram direcionados à caracterização química de polissacarídeo de algas marinhas, relacionando-os com possíveis atividades biológicas, além de obtenção e purificação de oligossacarídeos a partir de polissacarídeos previamente estudados. Dentre estes trabalhos podemos citar: determinação da estrutura química de galactanas isoladas a partir das algas *Cryptonemia crenulata* (ZIBETTI, 2001), *Porphyra columbina* (VIANA, 2001) e de *Acanthophora spicifera* (CAUDURO, 2000); determinação da estrutura química e atividade antiviral de galactanas sulfatadas, obtidas de *Bostrychia montagnei* (TULIO, 1998) e de galactofucanas sulfatadas isoladas da alga marrom *Sargassum stenophyllum* (MAJCZAK, 1999) e efeitos *in vitro* destes últimos polissacarídeos sobre células HeLa (STEVAN, 2001); e finalmente, a obtenção e purificação de oligossacarídeos piruvatados e sulfatados a partir de galactanas de algas vermelhas (GONÇALVES, 2001).

## **OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo dos carboidratos de baixa massa molecular em algas vermelhas (Divisão Rhodophyta).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Extrair e purificar os carboidratos de baixa massa molecular sintetizados pelas algas vermelhas (Rhodophyta);
- 2- Padronizar os métodos químicos, cromatográficos e espectroscópicos para a quantificação e determinação da estrutura química dos carboidratos de baixa massa molecular em algas vermelhas (Rhodophyta).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL DE TRABALHO

Os exemplares de algas vermelhas (Rhodophyta) foram coletados ao longo litoral brasileiro, abrangendo os estados de Santa Catarina e Pernambuco. Após serem retiradas do mar, as algas foram lavadas com água corrente e secas à sombra. Os exemplares foram classificados pela Prof<sup>a</sup>. Madalena Shirata (Depto. de Botânica, PUC-PR, Curitiba-PR) e pela Dra. Mutue Toyota Fujii (Instituto de Botânica, São Paulo-SP). Todas as espécies de algas analisadas e sua classificação estão relacionadas na TABELA 1.

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO\* DAS ALGAS QUE SÃO OBJETOS DE ESTUDO DESTE TRABALHO.

| Ordem         | Família        | Gênero                | Espécie                            |
|---------------|----------------|-----------------------|------------------------------------|
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Acanthophora</i>   | <i>Acanthophora spicifera</i>      |
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Bostrychia</i>     | <i>Bostrychia binderii</i>         |
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Chondrophyucus</i> | <i>Chondrophyucus flagellifera</i> |
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Chondrophyucus</i> | <i>Chondrophyucus translucida</i>  |
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Laurencia</i>      | <i>Laurencia arbuscula</i>         |
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Laurencia</i>      | <i>Laurencia clavata</i>           |
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Laurencia</i>      | <i>Laurencia filiformis</i>        |
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Laurencia</i>      | <i>Laurencia furcata</i>           |
| Ceramiales    | Rhodomelaceae  | <i>Polysiphonia</i>   | <i>Polysiphonia sp</i>             |
| Gracilariales | Gracilariaceae | <i>Gracilaria</i>     | <i>Gracilaria cervicornis</i>      |
| Nemaliales    | Galaxauraceae  | <i>Tricleocarpa</i>   | <i>Tricleocarpa cylindrica</i>     |

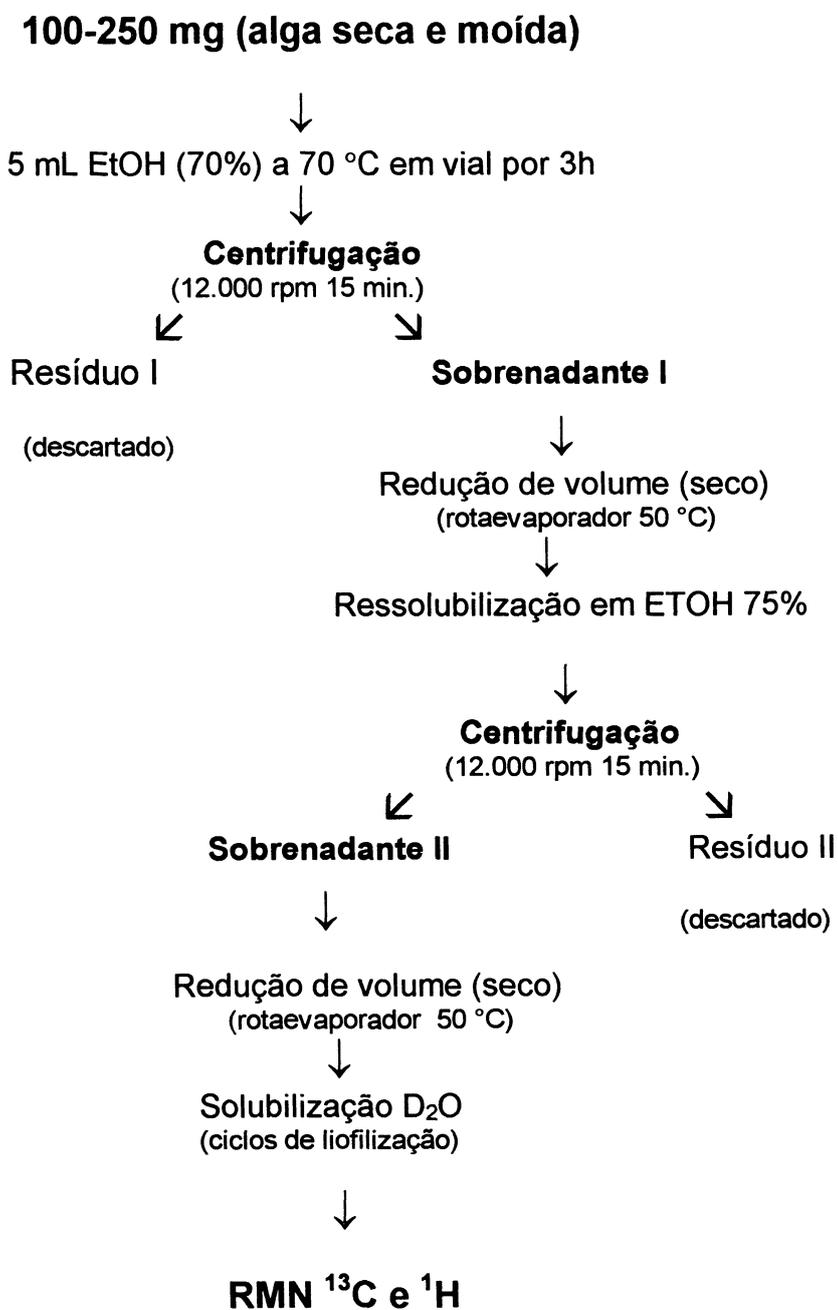
\*Madalena Shirata (Dpto. Botânica, PUC-PR), Curitiba-PR; Dra. Mutue Toyota Fujii (Instituto de Botânica, São Paulo).

## 3.2 EXTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

### 3.2.1 Extração etanólica qualitativa

A alga seca e moída (100-250 mg) foi submetida à extração com álcool etílico (70% v/v) (5 mL) sob agitação em banho na temperatura de 70 °C por 3 horas. O extrato obtido foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min (KARSTEN et al.,1991), obtendo-se o sobrenadante que contém os carboidratos de baixa massa molecular (sobrenadante I). O sobrenadante I foi reduzido de volume em rotaevaporador à temperatura de 50 °C e novamente ressolubilizado em etanol 75%, seguido de uma segunda centrifugação, realizada nas mesmas condições descritas acima. Esta segunda etapa de ressolubilização e centrifugação foi realizada na tentativa de eliminar ao máximo eventuais carboidratos de alta massa molecular que pudessem estar presente no extrato etanólico, obtendo-se desta maneira o sobrenadante II. Este material foi novamente levado a seco em rotaevaporador, à temperatura de 50 °C, e solubilizado em D<sub>2</sub>O (99,8%), seguindo-se ciclos de congelamento, liofilização e solubilização em D<sub>2</sub>O (99,8%) (3 ciclos) para troca dos hidrogênios hidroxílicos das moléculas presentes na solução por deutério. Após estes processos de preparo e pré-purificação da amostra, seguiu-se as análises de RMN-<sup>13</sup>C e RMN-<sup>1</sup>H. Estas etapas estão descritas no ESQUEMA I.

ESQUEMA I: ESQUEMA DE EXTRAÇÃO\* E PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISES DE RMN-<sup>13</sup>C E RMN-<sup>1</sup>H.



\* Extração etanólica qualitativa (ETOH 70%).

### 3.2.2 Extração etanólica quantitativa

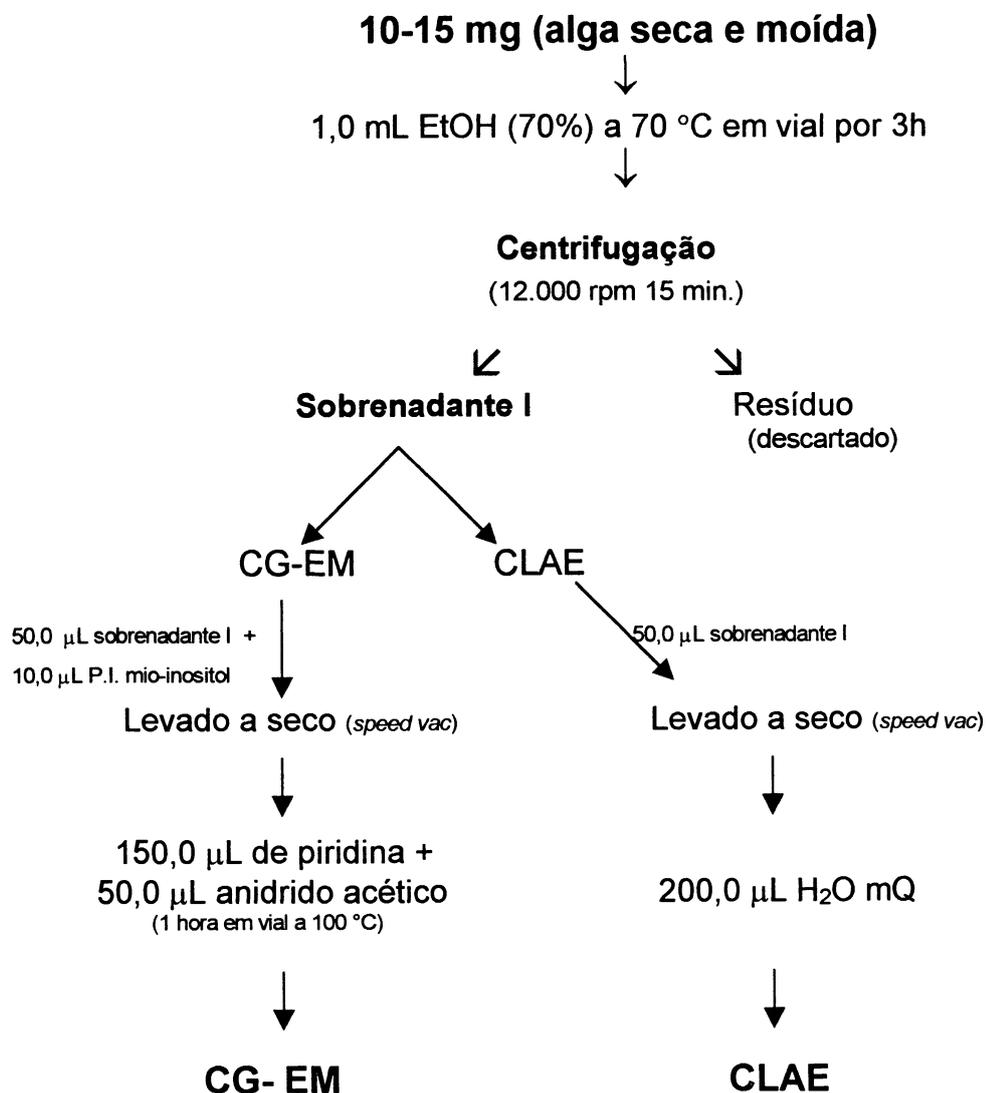
A alga seca e moída (10-15 mg exatamente) foi submetida a extração com álcool etílico (70% v/v) (1,0 mL) sob agitação, em banho a temperatura de 70 °C por 3 horas. O extrato obtido foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min (sobrenadante I). Este extrato etanólico, que contém os carboidratos de baixa massa molecular, foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) (KARSTEN et al., 1991).

Para as análises por CG-EM, tomou-se em um vial 50,0 µL do sobrenadante I (sobrenadante etanólico) e adicionou-se 10,0 µL de um padrão interno de mio-inositol. Esta solução foi levada a seco em aparelho de *Speed Vac* e ao resíduo foi adicionado 150,0 µL de piridina e 50,0 µL de anidrido acético (mistura acetilante). Este material foi mantido em estufa a 100 °C por 1h e posteriormente analisado diretamente por CG-EM. Este processo de derivatização da amostra foi realizado para obtenção de moléculas acetiladas de heterosídeos e padrão interno, as quais passam a ser voláteis e passíveis de se analisar por cromatografia gasosa (KARSTEN et al., 1991).

Da mesma forma que para as análises de CG-EM, as amostras de CLAE também utilizaram 50,0 µL do sobrenadante etanólico (sobrenadante I) que foi previamente levado a seco em *Speed Vac*. Os resíduos das amostras obtidos em *Speed Vac* foram solubilizados em 200,0 µL de H<sub>2</sub>O mQ e analisados diretamente por CLAE (volume de injeção: 20,0 µL). Para estas análises não foi necessária a adição de padrão interno, uma vez que foi realizada uma curva de calibração para cada heterosídeo de interesse (padronização externa).

Os passos de extração e preparo da amostra para estas análises quantitativas estão descritos no ESQUEMA II.

ESQUEMA II: ESQUEMA DE EXTRAÇÃO\* E PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISES POR CLAE E CG-EM.



\* Extração etanólica quantitativa.

### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.3.1 Detecção de açúcares totais

A detecção de açúcares totais foi realizada seguindo o método do fenol ácido sulfúrico desenvolvido por DUBOIS et al. (1956). Esta técnica permite a detecção de açúcares na ordem de 10 a 100  $\mu\text{g}$  e foi utilizada como método monitoramento da eluição de carboidratos nos eluatos das cromatografias de Filtração em Gel e Adsorção.

#### 3.3.2 Detecção de cloretos

A detecção de cloretos foi realizada com uso de solução de nitrato de prata a 7,5%, sendo feitas leituras turbidimétricas a 360 nm (adaptação – ASSUMPÇÃO; MORITA, 1968; JACKSON; McCANDLESS, 1978). Esta técnica foi utilizada para detecção de cloretos nas cromatografias de Filtração em Gel e Adsorção.

#### 3.3.3 Quantificação de sódio e potássio em espectrofotômetro de chama

A quantificação de sódio e potássio foi realizada em espectrofotômetro de chama da marca CELM, modelo FC-180. Utilizou-se para calibração a solução padrão para fotômetro de chama (CELM<sup>®</sup>) nas concentrações de 140  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{Na}^+$  e 5,0  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{K}^+$ .

Tomou-se 50  $\mu\text{L}$  do extrato etanólico (extração quantitativa, item 3.2.2) de cada alga analisada, os quais foram levados a seco (*Speed Vac*) e ressolubilizados em 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  mQ. Estas soluções foram analisadas diretamente no aparelho e suas absorbâncias comparadas com as absorbâncias dos padrões descritos acima.

### 3.3.4 Dosagem de cálcio livre

As dosagens de cálcio livre nas espécies de algas estudadas foram realizadas utilizando *kit* para dosagem de cálcio CALCIUM AS FS\* (*Diagnostic Systems*). Este método é baseado na formação de um complexo de cor azul formado por íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e o indicador metalocrômico *arsenazo* III, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional a concentração de cátions  $\text{Ca}^{2+}$  presente na amostra e pode ser medida fotometricamente em comprimento de onda de 630 a 670 nm. A possibilidade de interferência de íons magnésio no meio reacional foi eliminada pela adição do ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfônico. A estequiometria de formação de complexo do *arsenazo* III com íons cálcio é de 1:1 em pH 7,5 (BAUER, 1981).

Os testes foram realizados através da adição de 10  $\mu\text{L}$  de amostra/padrão ( $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) a 1000  $\mu\text{L}$  de reativo e suas absorvâncias lidas contra o branco de reativo a 670 nm. Os resultados são expressos em  $\text{mmol.L}^{-1}$  de massa da alga seca e moída (gramas).

## 3.4 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400, incorporado a Transformada de Fourier. As amostras, solubilizadas em 0,5 mL de água deuterada, foram colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro e analisadas à temperatura de 30 ou 40 °C

### 3.4.1 Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear monodimensionais

#### 3.4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ (RMN- $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz, em espectrômetro da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400. Utilizou-se o intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos para as aquisições dos sinais, sendo feitas, em média, 5 K aquisições. As amostras foram preparadas como descrito no item 2.2.1 e solubilizadas em 0,5 mL de  $\text{D}_2\text{O}$  (99,8%). As análises foram realizadas em tubos de 5 mm de diâmetro a uma temperatura de 30 °C. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm utilizando-se a acetona como padrão interno (30,200 ppm).

#### 3.4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)

Existem diferentes tipos de experimentos de DEPT, os quais diferem quanto ao ângulo de transferência de polarização ( $\theta_z = 45, 90$  ou  $135$ ) para observação de  $^{13}\text{C}$  acoplado a hidrogênio ( $^1\text{H}$ ). Variando-se este ângulo é possível visualizar os carbonos  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  e/ou  $\text{CH}_3$  como sinais negativos em relação à linha de base. É importante mencionar que nos três tipos de DEPT, os sinais dos carbonos quaternários (não ligados diretamente ao H) não aparecem. Assim, os espectros de RMN –  $^{13}\text{C}$  DEPT foram obtidos em um  $\theta_z$  de  $135^\circ$ , onde  $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$  ocorrem em fase positiva em relação à linha de base, enquanto que  $\text{CH}_2$  aparece em fase negativa. A frequência utilizada foi de 100,61 MHz em janela espectral de 220 ppm e resolução de 32 K.

### 3.4.1.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) foram obtidos em frequência de 400,13MHz em espectrômetro BRUKER, série Avance, modelo DRX 400. As amostras foram extraídas como especificado no item 2.2.1, e redissolvidas em 0,5 mL de D<sub>2</sub>O (99,8%). Essas soluções foram submetidas a ciclos de liofilização e ressolubilização em D<sub>2</sub>O (99,8%) (3 vezes) para troca dos hidrogênios hidroxílicos ligados às moléculas por deutério. As amostras foram então colocadas em tubo de 5 mm de diâmetro e analisadas à temperatura de 40 °C. Foram realizados 16 *scans* para cada amostra analisada. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm utilizando a acetona como padrão interno (2,224 ppm).

### 3.4.2 Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear bidimensionais

#### 3.4.2.1 COSY (*Correlation Spectroscopy*)

Esta é uma técnica bidimensional homonuclear utilizada para correlação dos deslocamentos químicos dos núcleos de hidrogênios vicinais. Desta forma, o H-1 de um monossacarídeo apresenta acoplamento com o H-2 da mesma unidade, sendo possível observar esta interação na forma de um pico cruzado (*cross peak*) formado a partir dos sinais de hidrogênios vicinais observados na diagonal do espectro. É também possível quantificar esta interação pela determinação da constante de acoplamento (J) e ainda determinar o deslocamento químico do H-2 a partir da correlação H-1/H-2. A partir do sinal de H-2 pode ser determinado o H-3 e assim sucessivamente ao longo do anel. Como cada unidade monossacarídica apresenta um padrão de constantes de acoplamento característico, com estes resultados é possível determinar o tipo de açúcar presente na estrutura.

### 3.4.2.2 HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy*)

Esta técnica heteronuclear ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) faz a correlação dos sinais referentes ao núcleo de hidrogênio e o núcleo de carbono ao qual está ligado aquele hidrogênio. Desta forma permite determinar quais átomos de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) estão ligados a quais átomos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) a partir de sinais de  $^{13}\text{C}$  conhecidos ou de sinais de  $^1\text{H}$  já determinados por COSY.

## 3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

### 3.5.1 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em aparelho SHIMADZU equipado com detector por índice de refração (RID 10A) da marca SHIMADZU, a uma temperatura de 40 °C. Foram utilizadas dois tipos de colunas para a caracterização e quantificação dos CBMM. Uma coluna para monossacarídeos (coluna REZEX RPM MONOSACCHARIDE 300 x 7,80 mm – PHENOMENEX), a qual utiliza como fase móvel  $\text{H}_2\text{O}$  mQ (desgaseificada com gás hélio) à temperatura de 80 °C. A segunda coluna utilizada foi uma coluna para ácidos orgânicos (coluna HPX-87H 300 x 7,80 mm (AMINEX® ION EXCLUSION-BIO RAD), a qual utiliza como fase móvel solução de ácido sulfúrico 8  $\text{mM.L}^{-1}$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  8  $\text{mM.L}^{-1}$ ) em  $\text{H}_2\text{O}$  mQ (desgaseificada com gás hélio). A concentração de floridosídeo e de digeneasídeo foi calculada pelo método de padronização externa, estipulada por curvas de calibração para cada um dos padrões (floridosídeo e digeneasídeo). Para estas análises, as amostras foram preparadas como descrito no item 3.2.2 (KARSTEN et al., 1991).

### 3.5.2. Cromatografia de Adsorção (carvão-Celite 1:1)

A cromatografia de adsorção (WHISTLER; DURSO, 1950) foi realizada utilizando-se carvão-Celite em uma coluna de vidro (6,5 x 1,2 cm d.i.) equipada com placa porosa, tendo um volume total de aproximadamente 24,5 mL. A montagem deste sistema cromatográfico foi realizada da seguinte forma: primeiramente, uma camada fina de Celite foi adicionada e em seguida o volume da coluna preenchido com uma mistura de carvão-Celite (1:1). A amostra foi eluída sob pressão atmosférica utilizando-se inicialmente H<sub>2</sub>O mQ, sendo coletadas frações de 10 mL. A eluição prosseguiu até que o eluato apresentasse reação negativa para cloretos pela reação com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) e negativa para açúcares totais pelo método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS, et al., 1956). A seguir, a amostra foi eluída em gradiente descontínuo de etanol a 25, 50, 75 e 100%. De maneira similar à eluição aquosa, os açúcares totais foram monitorados pelo método de DUBOIS et al. (1956).

### 3.5.3 Cromatografia de Filtração em Gel

As cromatografias de filtração em gel foram realizadas em coluna de vidro (1 m x 1,5 cm d. i.) contendo BioGel P-2 (faixa de exclusão: 1800-100 Daltons) com volume morto ( $V_0$ ) e volume total ( $V_t$ ) de 54 mL e 176 mL, respectivamente. O  $V_0$  foi determinado pela eluição de *Blue dextran* (componente com massa molecular acima do limite de inclusão do gel), acompanhado pela leitura do eluato aquoso em espectrofômetro (625 nm). O volume total da coluna foi medido através da adição de água na coluna até o nível determinado a ser preenchido pelo gel.

Utilizou-se H<sub>2</sub>O mQ (pH 6,51) como eluente e a detecção dos açúcares foi feita pelo método de fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Também foram realizadas cromatografias com variação do pH da fase móvel (pH 2,51 e 4,50), obtida mediante acidificação com ácido clorídrico 1 N até o pH desejado.

### 3.5.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As amostras analisadas foram submetidas a extração como especificado no item 3.2.2 (ESQUEMA II). As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-23 da marca J. W e acoplado à espectrômetro de massa da marca FINNIGIAN MAT, modelo ITD 800. Foi utilizado hélio (He) como gás de arraste. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 me V, repetidamente a cada 1/8 de segundo, na faixa de 90 a 550  $m/z$  (razão massa carga).

### 3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA (ESI-MS - *Eletrospray Ionization* – *Mass Spectroscopy*)

As análises de espectrometria de massa foram realizadas por ESI-MS (*Eletrospray Ionization* – *Mass Spectroscopy*), utilizando espectrômetro MICROMASS QUATTRO LC. Para determinação da massa molecular dos heterosídeos obtidos (floridosídeo e digeneasídeo), as amostras foram dissolvidas em água ultra pura (mQ), sendo introduzidas no aparelho por injeção direta em fluxo de acetonitrila de 0,1 mL.min<sup>-1</sup>. As seleções dos íons foram feitas por um quadrupolo, utilizando uma janela de massa de 10-1300  $m/z$ . Foram utilizados parâmetros para a obtenção de íons no modo negativo (íons moleculares [M]<sup>-</sup> ou [2M+Na]<sup>-</sup>) para digeneasídeo e modo positivo (íons moleculares [M+Na]<sup>+</sup>) para floridosídeo.

### 3.7 TRATAMENTO DO DIGENEASÍDEO COM RESINA CATIÔNICA (DOWEX 50-X8)

Como no ambiente marinho há uma abundância de íons e uma vez que a molécula de digeneasídeo possui um grupamento carboxílico, existe a possibilidade de que este composto possa estar ligado a diferentes cátions após os processos de extração ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , etc). Para obter o padrão de digeneasídeo na forma de um único sal, a amostra foi tratada com uma resina catiônica na forma de sal de sódio. A resina utilizada (DOWEX 50-X8) possui base de poliestireno, com grupo funcional sulfônico. Foi montada uma coluna com tal resina e então tratada com NaOH 1M, para garantir que seus grupos funcionais estivessem ligados ao sódio, seguido de lavagem com  $\text{H}_2\text{O}$  mQ até pH 6,51. A amostra foi então aplicada na coluna e eluída com  $\text{H}_2\text{O}$  mQ ( $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Após este tratamento a amostra foi levada a seco e seguiu-se novas análises.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma correta caracterização química e quantificação dos carboidratos de baixa massa molecular (floridosídeo e digeneasídeo) nas espécies de algas estudadas, o primeiro passo foi a obtenção de padrões destes compostos.

### 4.1 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE FLORIDOSÍDEO OBTIDO DA ALGA *Acanthophora spicifera*

Como não existem padrões comerciais de  $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerol (floridosídeo), fez-se necessária a otimização de uma técnica para obtenção de um padrão deste heterosídeo. A fonte de matéria prima escolhida foi a alga *Acanthophora spicifera* (M. Vahl) Borgisen, pertencente à ordem Ceramiales. Esta alga foi escolhida devido a grande quantidade de material disponível e pela observação, durante análises de RMN-<sup>13</sup>C do extrato etanólico desta alga, da presença de sinais referentes ao heterosídeo floridosídeo.

A alga *A. spicifera* (250 mg alga seca e moída) foi submetida a uma extração etanólica qualitativa como descrito no item 3.2.1 (ESQUEMA I). Após extração e centrifugação, o sobrenadante etanólico foi levado a seco e solubilizado em D<sub>2</sub>O (99,8%) para análise de RMN -<sup>13</sup>C. A análise do espectro de ressonância magnética nuclear desta amostra (FIGURA 3) apresentou 17 sinais principais entre a região de 110 a 60 ppm.

Através da comparação dos deslocamentos químicos dos sinais obtidos para esta amostra, com os assinalamentos dos heterosídeos (floridosídeo e digeneasídeo) publicado por KARSTEN et al. (1999) (TABELA 2), foi possível caracterizar a presença de ambos heterosídeos no extrato etanólico da alga *A. spicifera*. Todos os sinais principais do espectro de RMN-<sup>13</sup>C foram assinalados (TABELA 3), apresentando uma variação entre 0,9 e 1,0 ppm, para os assinalamentos proposto por KARSTEN et al. (1999).

TABELA 2: ASSINALAMENTOS NO ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  PARA FLORIDOSÍDEO E DIGENEASÍDEO SEGUNDO KARSTEN et al. (1999).

| <b>Carbono</b> | <b>Digeneasídeo (ppm)</b> | <b>Floridosídeo (ppm)</b> |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| C-1            | 99,4                      | 98,9                      |
| C-2            | 70,9                      | 69,3                      |
| C-3            | 71,2                      | 70,2                      |
| C-4            | 67,6                      | 70,1                      |
| C-5            | 73,8                      | 71,9                      |
| C-6            | 63,9                      | 62,3                      |
| C-1'           | 177,7                     | 61,9                      |
| C-2'           | 78,8                      | 79,6                      |
| C-3'           | 61,8                      | 61,3                      |

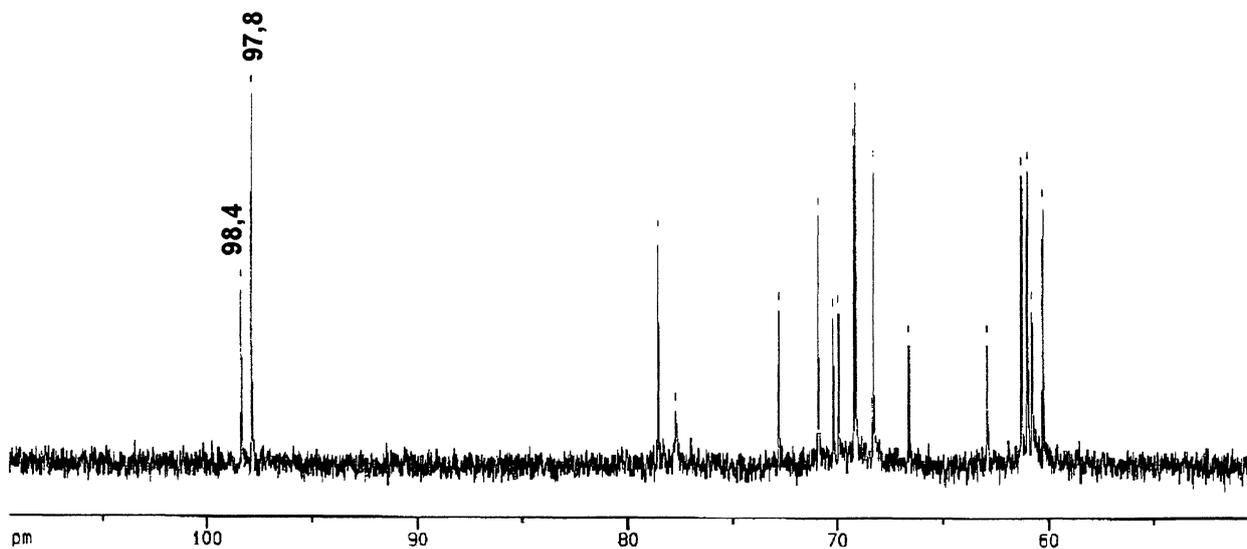
Fonte: KARSTEN et al., 1999.

TABELA 3: ASSINALAMENTOS NO ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DO EXTRATO ETANÓLICO\* DE *Acanthophora spicifera*.

| <b>Carbono</b> | <b>Digeneasídeo (ppm)</b> | <b>Floridosídeo (ppm)</b> |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| C-1            | 98,4                      | 97,8                      |
| C-2            | 70,0                      | 68,5                      |
| C-3            | 70,3                      | 69,3                      |
| C-4            | 66,7                      | 69,1                      |
| C-5            | 72,9                      | 70,9                      |
| C-6            | 60,9                      | 61,5                      |
| C-1'           | 176,8                     | 61,2                      |
| C-2'           | 77,9                      | 78,8                      |
| C-3'           | 62,9                      | 60,4                      |

\* Extração qualitativa; C'-1 a C'-3, são referentes ao ácido glicérico do digeneasídeo e glicerol do floridosídeo.

FIGURA 3: ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C OBTIDO DO EXTRATO ETANÓLICO\* DA ALGA *Acanthophora spicifera*.



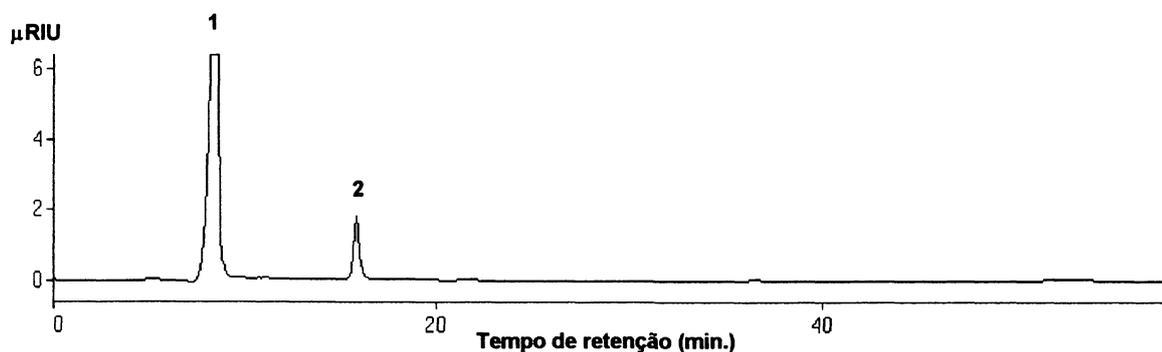
\* Extração etanólica qualitativa; 98.4 ppm: referente ao C-1 do digeneasídeo; 97.8: referente ao C-1 do floridosídeo.

Os sinais de menor intensidade são referentes ao heterosídeo digeneasídeo, o qual apresenta o sinal do seu carbono anomérico em 98,4 ppm, enquanto que os sinais de maior intensidade referem-se ao floridosídeo, com sinal do carbono anomérico em 97,8 ppm.

A alga *A. spicifera* (12,0 mg alga seca e moída) foi submetida a uma extração etanólica quantitativa como descrito no item 3.2.2 (ESQUEMA II). Após esta extração, 50  $\mu$ L do sobrenadante etanólico foi levado a seco (*speed vac*) e solubilizado em 200 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para essa análise foi utilizada uma coluna de estireno divinilbenzeno sulfonada na forma de sal de chumbo. O cromatograma obtido (FIGURA 4) mostrou a presença de dois picos principais (1 e 2), com tempos de retenção em 7,85 e 15,83 min, respectivamente.

FIGURA 4: CROMATOGRAMA DA ANÁLISE POR CLAE DO EXTRATO ETANÓLICO\* DA ALGA *Acanthophora spicifera*.



- Coluna: REZEX RPM Monosaccharide
- Dimensões: 300 x 7.8 mm
- Pré-coluna: REZEX RPM Monosaccharide
- Fase Móvel: H<sub>2</sub>O mQ
- Temperatura da coluna: 80 °C
- Detector: RID/40 °C
- Fluxo: 0,55 mL.min<sup>-1</sup>

\* Extração quantitativa.

Apesar de apresentar apenas dois picos principais, o cromatograma obtido mostrou que a coluna utilizada para esta análise apresenta uma eficiência cromatográfica apenas para o componente com tempo de retenção em 15,83 min (PICO 2), uma vez que, o pico com tempo de retenção de 7,85 min (PICO 1) está no volume morto da coluna ( $V_0$ ) e, portanto, componentes com tempo de retenção em 7,85 min não estão interagindo com a coluna (componentes não retidos). Diante deste resultado, foi realizado o fracionamento e purificação do extrato etanólico da alga *A. spicifera* para identificação e caracterização do componente de interesse (floridosídeo).

WHISTLER; DURSO (1950), propuseram um método para separação e purificação de mono- e oligossacarídeos baseado na força de adsorção destes carboidratos em uma mistura de carvão ativo e Celite (1:1), seguido de eluição aquosa e eluição em gradiente descontínuo de etanol em várias concentrações, sob vácuo em funil de Büchner. No presente trabalho, a cromatografia foi realizada em coluna de vidro, sem o auxílio de vácuo durante a eluição, como descrito em materiais e métodos, item 3.5.2.

O sobrenadante etanólico da extração qualitativa da alga *A. spicifera* foi levado a seco e solubilizado em 1 mL de H<sub>2</sub>O mQ. A esta solução foi adicionado 0,2 g de carvão-Celite (1:1) e a mistura aplicada na coluna de cromatografia de adsorção em carvão-Celite. A amostra foi inicialmente eluída com H<sub>2</sub>O mQ e coletada em frações de 10 mL até resposta negativa para cloretos e açúcares totais. A seguir, a amostra foi eluída em gradiente descontínuo com etanol 25% (v/v) até ser negativa para açúcares totais (FIGURA 5). O eluato aquoso apresentou cloretos co-eluído com açúcares. O perfil cromatográfico acompanhado pela determinação de açúcares totais apresentou-se na forma de um pico assimétrico.

Na tentativa de se identificar qual ou quais açúcares estavam presentes no eluato aquoso, os conteúdos dos tubos 1-57 foram agrupados e levado a seco. Esta amostra foi então ressolubilizada em D<sub>2</sub>O (99,8%) e então analisada por ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C. A análise do espectro de RMN-<sup>13</sup>C (FIGURA 6) mostrou, na região de 110 a 60 ppm, a presença de 8 sinais principais e alguns sinais de menor intensidade. Através da comparação com os assinalamentos de sinais publicado por KARSTEN et al. (1999), foi possível detectar a presença do heterosídeo digeneasídeo nesta amostra. Porém, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), mostrou um cromatograma com um pico em 7,85 min, indicando, como ressaltado anteriormente (FIGURA 4), que estes componentes não interagem com a coluna, e que portanto, nada pode ser afirmado quanto a sua pureza (cromatograma não mostrado).

FIGURA 5: PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Acanthophora spicifera*.

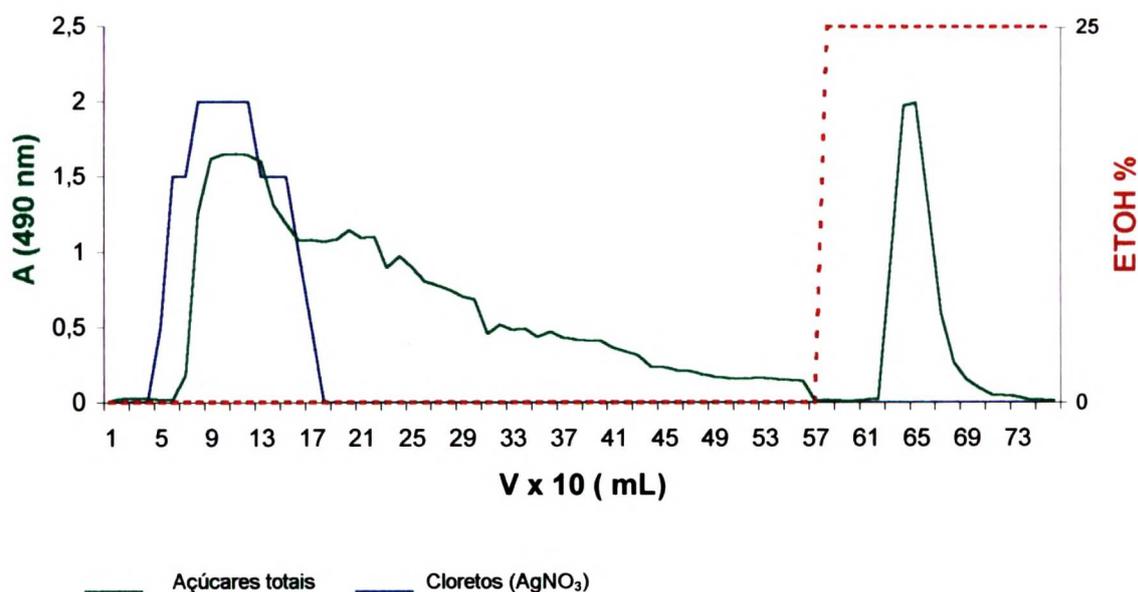
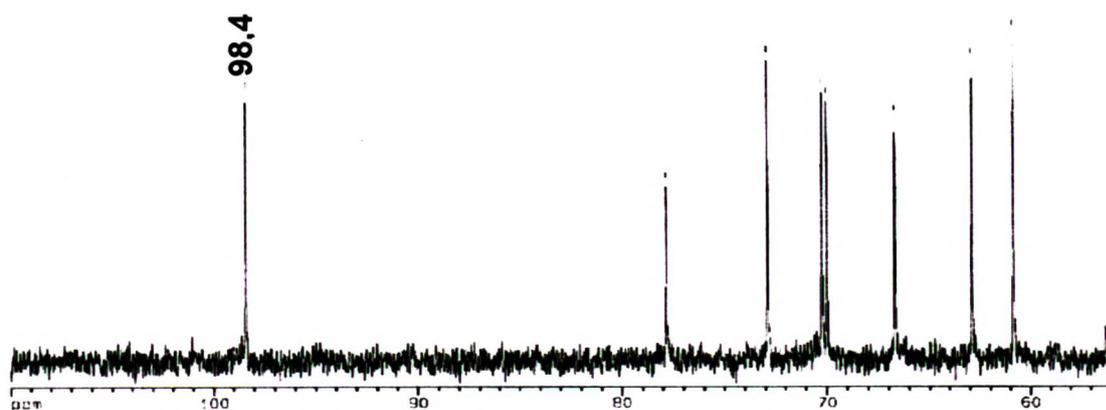


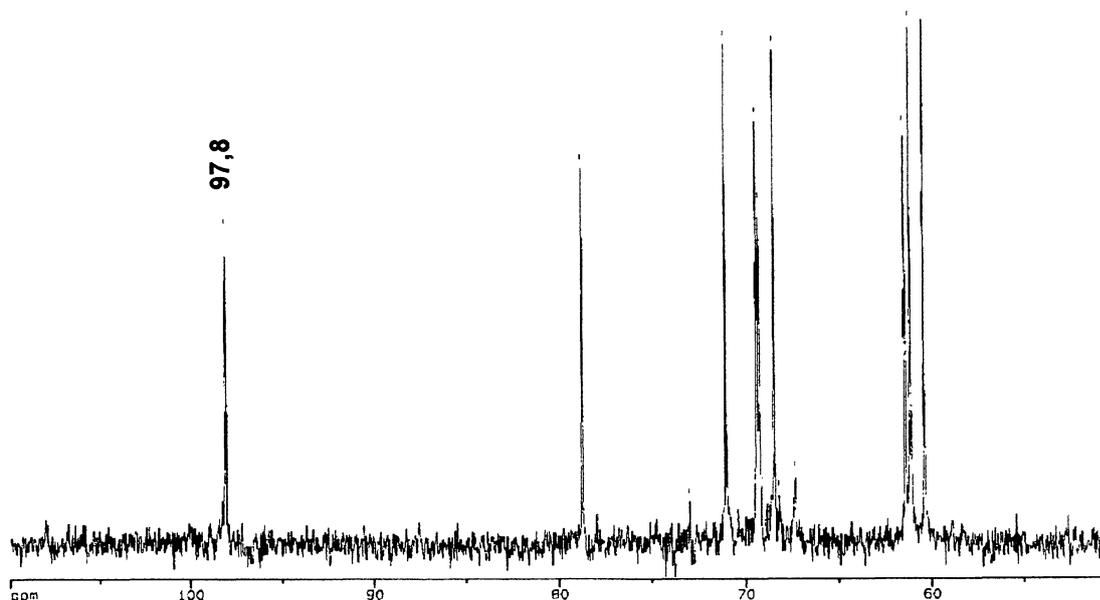
FIGURA 6: ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C\* DO ELUATO AQUOSO OBTIDO DA ALGA *Acanthophora spicifera* POR CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1).



\* 98,4 ppm: Sinal referente ao carbono anomérico (C-1) da molécula de digeneasídeo.

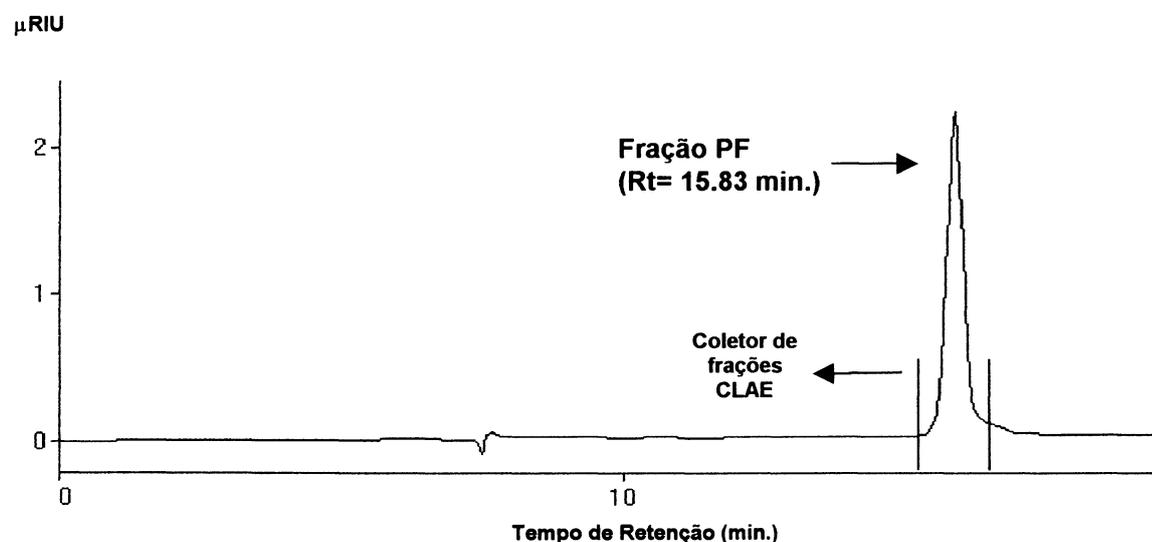
Quando seguiu-se a eluição da coluna de carvão-Celite com etanol 25%, obteve-se um pico com perfil mais simétrico e livre da presença de cloretos. O conteúdo dos tubos referentes a esta eluição (tubos 59-75) foram agrupados e levado a seco (fração PF), resolubilizada em D<sub>2</sub>O (99,8%) e analisada por ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração PF mostrou a presença de 9 sinais principais referentes ao heterosídeo floridosídeo (FIGURA 7), enquanto que, a análise de CLAE mostrou apenas um pico em 15,83 min (FIGURA 8).

FIGURA 7: ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C\* DO ELUATO ETANÓLICO (ETOH 25%) OBTIDO DA ALGA *Acanthophora spicifera* APÓS CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1).



\* 97,9 ppm: Sinal referente ao carbono anomérico (C-1) da molécula de floridosídeo.

FIGURA 8: ANÁLISE POR CLAE DO ELUATO ETANÓLICO (ETOH 25%) OBTIDO DA EXTRAÇÃO QUALITATIVA DA ALGA *Acanthophora spicifera* POR CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1).



- Coluna: REZEX RPM Monosaccharide
- Dimensões: 300 x 7.8 mm
- Pré-coluna: REZEX RPM Monosaccharide
- Fase Móvel: H<sub>2</sub>O:mQ
- Temperatura da coluna: 80 °C
- Detector: RID/40 °C
- Fluxo: 0,55 mL.min<sup>-1</sup>

A confirmação de que a fração PF correspondia ao heterosídeo floridosídeo purificado, obtido da alga *A. spicifera* foi realizada por quatro técnicas: CLAE, RMN-<sup>13</sup>C, ESI-MS e CG-EM.

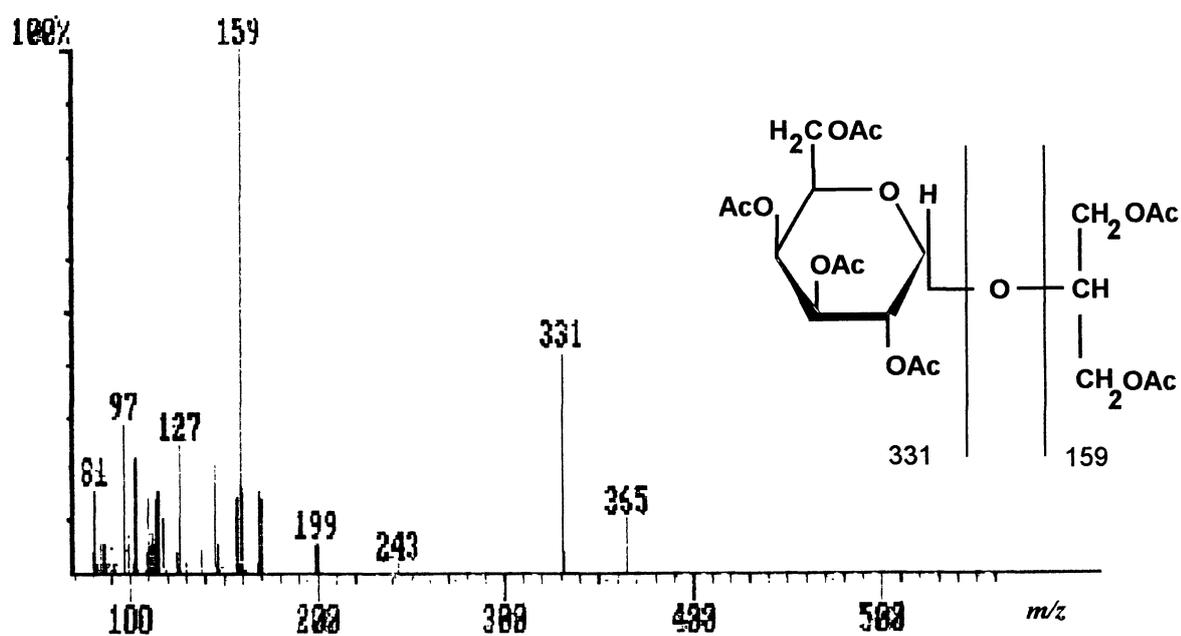
Foram realizadas repetidas injeções em aparelho de CLAE da fração PF (cromatografia preparativa). Os cromatogramas dessas injeções mostraram um único pico em 15,83 min, o qual foi coletado em coletor de frações adaptado ao aparelho de CLAE (FIGURA 8). A fração coletada (PFc) foi levada a seco e submetida a três técnicas para comprovação da estrutura química: 1) derivatização e análise por CG-EM; 2) hidrólise ácida e análise por CLAE, e 3) análise por ESI-MS.

No processo 1) parte da fração PFc foi submetida a acetilação com piridina e anidrido acético como descrito no item 3.2.2 e analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. O espectro de massa obtido do pico com

tempo de retenção de 41,06 min (FIGURA 9) mostrou dois fragmentos de massa principais com  $m/z$  de 159 e 331.

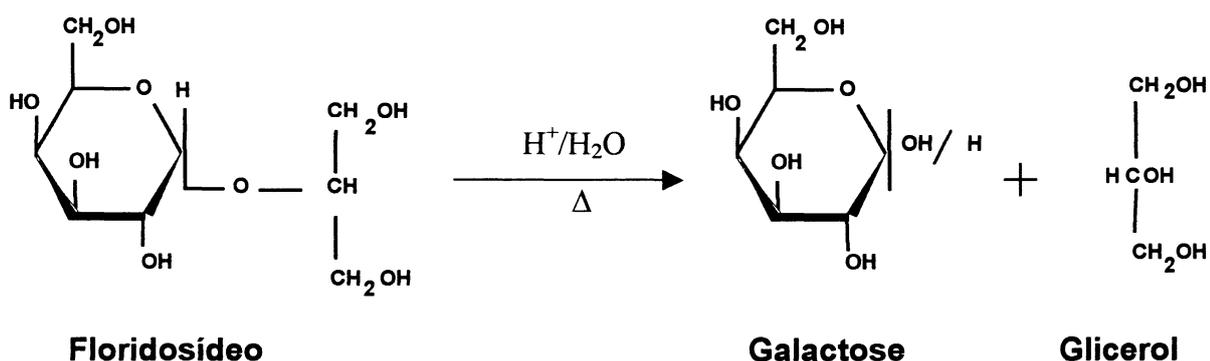
Estes fragmentos correspondem a uma fragmentação da molécula de floridosídeo acetilada como indicado na FIGURA 9.

FIGURA 9: ESPECTRO DE MASSA\* OBTIDO POR CG-EM DA FRAÇÃO PFc ACETILADA DA ALGA *A. spicifera*.



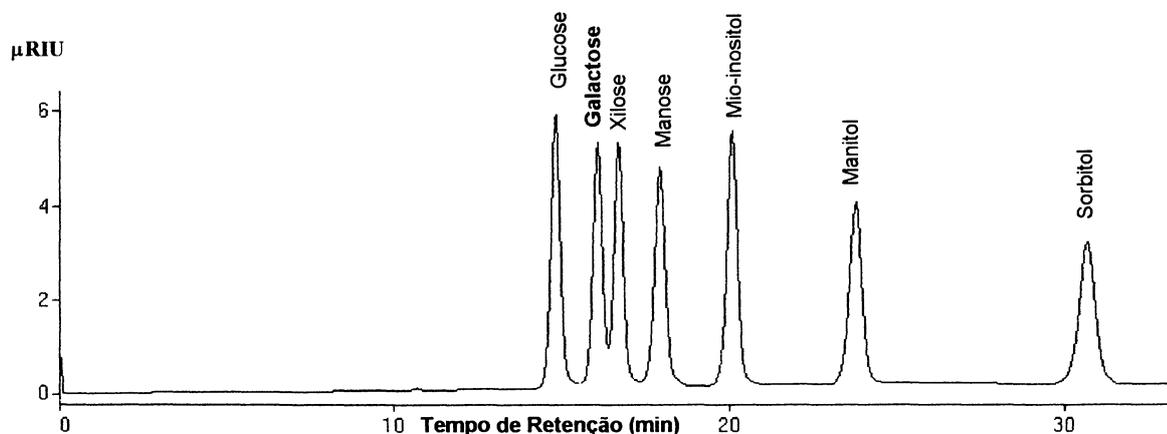
\* Fragmentação do derivado acetilado da molécula de floridosídeo.

Para a caracterização da fração PFc por CLAE, parte desta fração foi submetida à hidrólise ácida com ácido trifluoroacético (TFA) 1M, 100 °C durante 4 h. A estratégia foi realizada com a intenção de se obter, após hidrólise, dois componentes principais (galactose e glicerol), os quais seriam caracterizados por CLAE, seguindo o esquema proposto abaixo:



Para caracterização por CLAE de galactose e glicerol seguindo o esquema proposto acima, seria necessário a utilização de uma coluna que resolvesse entre os compostos glicerol e galactose e que permitisse diferenciar a galactose de outras possíveis hexoses que poderiam estar presentes no meio de reação. Foi então utilizada a coluna REZEX RPM-MONOSACCHARIDE, uma coluna específica para monossacarídeos. Foram preparados vários padrões de hexoses, pentoses e alditóis, os quais foram injetados separadamente na coluna para determinação de seus respectivos tempos de retenção. Em seguida foi preparado uma mistura desses padrões que foi analisada por CLAE para verificar a resolução desta coluna para estes componentes (FIGURA 10). Desta forma, foi possível determinar os tempos de retenção referentes à galactose e glicerol, além dos outros padrões injetados.

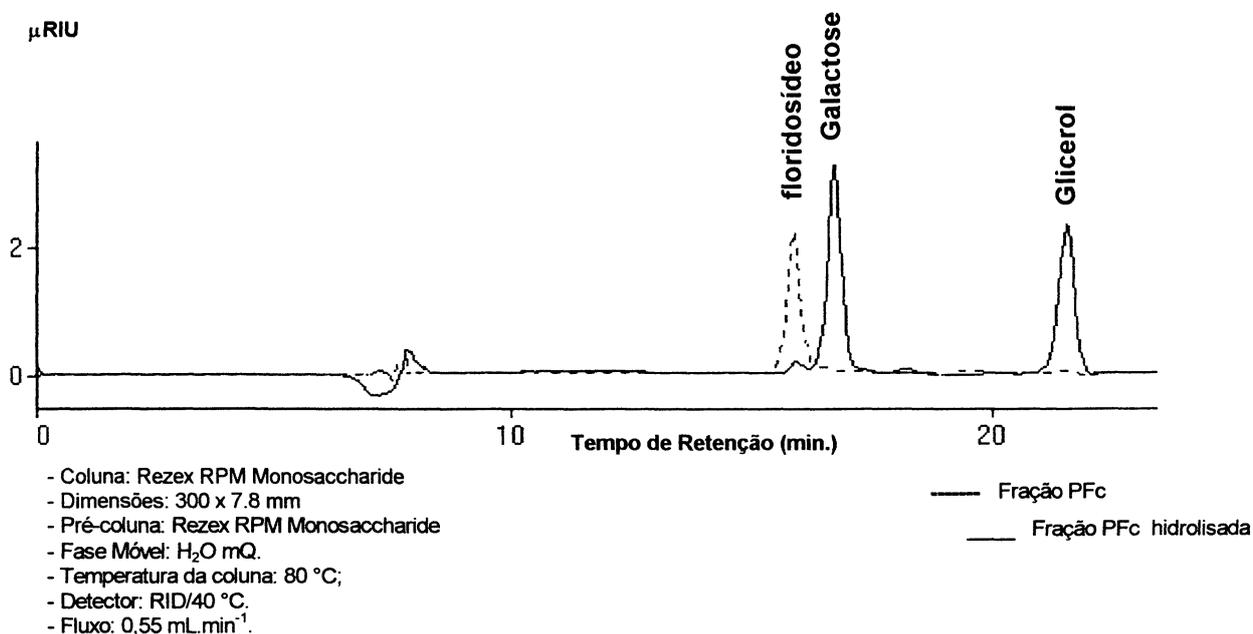
FIGURA 10: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DE PADRÕES DE MONOSSACARÍDEOS (HEXOSES E PENTOSSES) E ALDITOIS.



- Coluna: Rezex RPM Monosaccharide
- Dimensões: 300 x 7.8 mm
- Pré-coluna: Rezex RPM Monosaccharide
- Fase Móvel: H<sub>2</sub>O mQ
- Temperatura da coluna: 80 °C
- Detector: RID/40 °C
- Fluxo: 0,55 mL.min<sup>-1</sup>

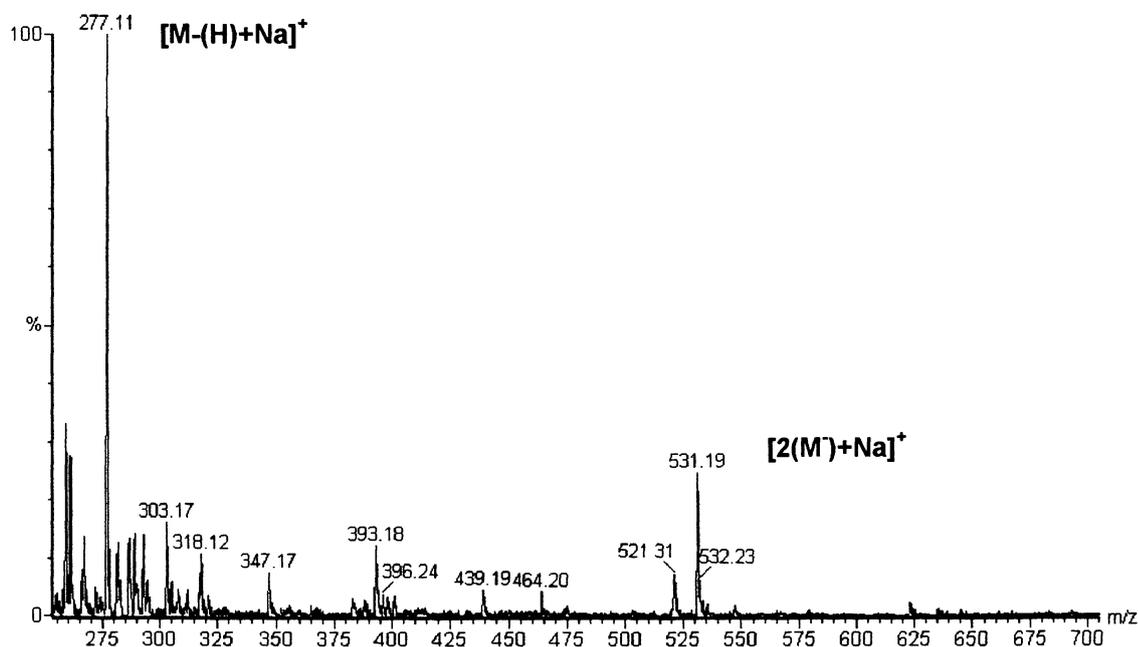
Em seguida, foram realizadas injeções em CLAE da fração PFC e dos produtos de hidrólise desta fração. Para a fração PFC foi obtido um pico em 15,83 min, relativo ao floridosídeo, enquanto que, para o hidrolisado desta fração, foram obtidos dois picos principais, um referente a galactose (TR= 16,67 min) e outro ao glicerol (TR=21,52 min). A FIGURA 11 mostra uma sobreposição destes cromatogramas. É possível ainda verificar, no cromatograma da fração hidrolisada, a presença de um pequeno pico em 15,83 min, o qual corresponde a moléculas do heterosídeo floridosídeo que não foram hidrolisadas, mostrando que as condições de hidrólise a que foi submetida à amostra não propiciaram uma hidrólise completa de toda a amostra.

FIGURA 11: SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE DAS FRAÇÕES PF<sub>c</sub> E PF<sub>c</sub> HIDROLISADA.



A análise por ESI-MS da fração PF foi realizada como descrito no item 4.6, em que foram utilizados parâmetros para a obtenção de íons no modo positivo (íons moleculares  $[M-(H)+Na]^+$ ). O espectro obtido mostrou a presença de dois íons principais com  $m/z$  de 277,11 e 531,19. O heterosídeo floridosídeo possui massa molecular de 254,24 e, quando somado ao sódio, fornece o valor 277,23, o que justifica no espectro o íon de 277,11  $m/z$ . A presença do íon de 531,19 é explicado pela ionização de duas moléculas de floridosídeo mais o sódio  $[2(254,24)+22,99 = 531,47]$  (FIGURA 12).

FIGURA 12: ESPECTRO DE ESI-MS\* DA FRAÇÃO PF.



\*M = 254,24 (PM FLORIDOSÍDEO)  
Na = 22,99 PM

Assim sendo, os resultados apresentados acima demonstraram que a cromatografia de adsorção em carvão-Celite (1:1) mostrou-se eficiente para a purificação do heterosídeo floridosídeo dos demais componentes da amostra, a partir da extração etanólica qualitativa da alga *A. spicifera*.

As análises de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), espectrometria de massa (ESI-MS) e também cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) confirmam que a fração PF, obtida de *A. spicifera*, corresponde ao heterosídeo floridosídeo purificado, o qual será na sequência deste trabalho utilizado como padrão.

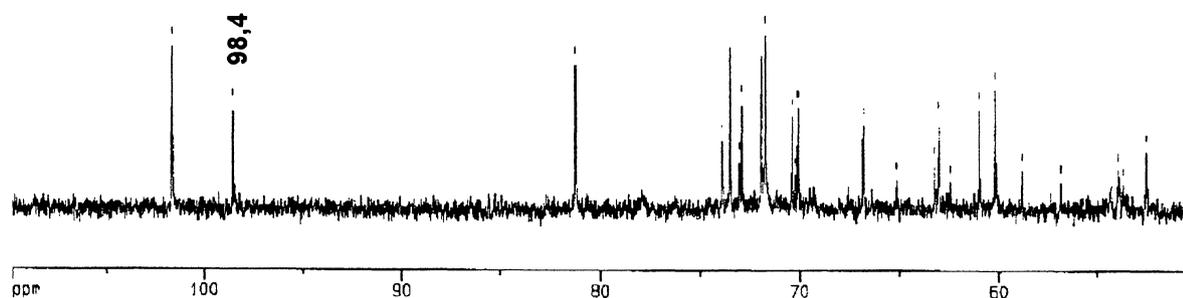
## 4.2 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE DIGENEASÍDEO OBTIDO DA ALGA *Bostrychia binderii*

Da mesma forma que para o floridosídeo, não existe comercialmente disponível  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato (digeneasídeo). Para a obtenção deste composto, foi utilizado como fonte de matéria prima a alga *Bostrychia binderii* Harvey, pertencente a ordem Ceramiales. Esta alga foi escolhida devido a disposição de grande quantidade de material e por relatos na literatura da presença de digeneasídeo em espécies pertencentes a este gênero (KREMER, 1976). A espécie foi coletada no litoral catarinense, na praia de Bombinhas, no mês de dezembro de 1997.

A alga seca e moída (86g) foi suspensa em 700 mL de metanol 85% (MeOH 85%) e submetida a refluxo (60 °C) durante 1:30h por 4 vezes. Os extratos metanólicos foram reunidos e centrifugados. O sobrenadante desta centrifugação, contendo principalmente os carboidratos de baixa massa molecular, foi submetido à redução de volume (rotaevaporador) até secura, ressolubilizado em etanol 75% (v/v) e novamente centrifugado para a eliminação dos carboidratos de alta massa molecular, tidos como contaminantes. Novamente, o sobrenadante foi reduzido de volume até a secura total e, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima, solubilizado em água e liofilizado.

O material obtido apresentou-se na forma de um gel (mesmo após o processo de liofilização) e sua massa foi obtida por diferença de pesagem, sendo de 3,1g. A amostra liofilizada foi solubilizada em D<sub>2</sub>O na concentração de aproximadamente 100 mg.mL<sup>-1</sup>, para análise em RMN-<sup>13</sup>C. O espectro desta análise (FIGURA 13) apresentou na região de 60 a 110 ppm vários sinais relativos a carboidratos, destacando-se o sinal em 98,4 ppm, relativo ao C-1 do heterosídeo digeneasídeo. Devido a heterogeneidade observada no espectro de RMN-<sup>13</sup>C, esta foi submetida à cromatografia de adsorção em carvão-Celite (1:1).

FIGURA 13: ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C\* DO EXTRATO METANÓLICO DA ALGA *Bostrycia binderii*.

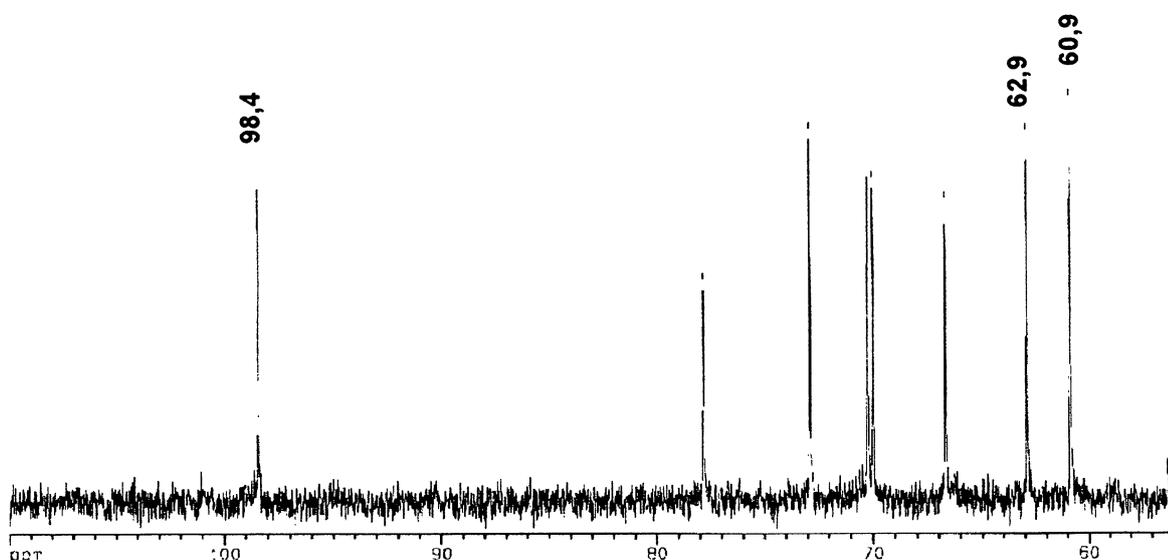


\* 98,4 ppm: sinal referente ao carbono anomérico (C-1) da molécula de digeneasídeo.

A amostra (aproximadamente 200 mg) foi eluída primeiramente com H<sub>2</sub>O mQ, sendo os eluatos submetidos à análises de detecção de açúcares totais (fenol ácido sulfúrico) e de cloretos (reação com nitrato de prata). Duas frações foram obtidas na eluição aquosa, sendo que a primeira (BB-A1) apresentou reação positiva para cloretos e açúcares, enquanto que a segunda (BB-A2) apresentou reação positiva apenas para açúcares. Estas duas frações foram submetidas à análise por CLAE, na intenção de se verificar o grau de pureza e possíveis diferença entre a composição de carboidratos entre as mesmas.

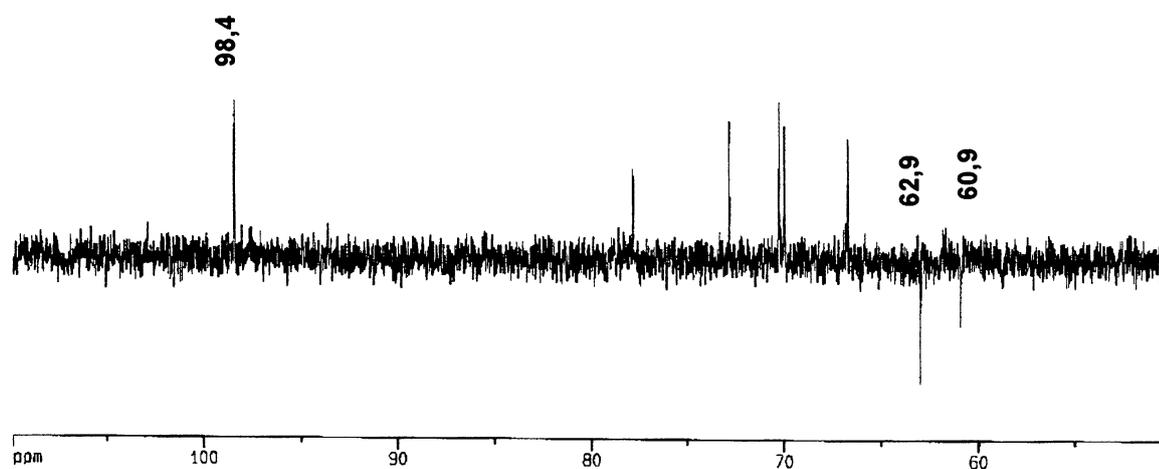
As duas frações (BB-A1 e BB-A2) apresentaram o mesmo perfil cromatográfico por CLAE, porém com diferenças apenas nas concentrações dos componentes das amostras (cromatogramas não mostrados). Desta maneira, estas amostras foram reunidas e liofilizadas, passando a ser denominada fração BB-A12. Esta fração foi então submetida a análises de RMN-<sup>13</sup>C (FIGURAS 14 e 15). Os resultados destas análises mostraram 8 sinais principais nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C, referentes ao heterosídeo digeneasídeo. Além disso, o experimento de DEPT-135 (FIGURA 15), o qual promove a inversão dos sinais referentes aos carbonos CH<sub>2</sub>, mostrou a inversão dos sinais em 60,9 e 62,9 ppm, respectivamente referentes aos carbonos C-6 da manose e C'-3 do ácido glicérico, constituintes da molécula de digeneasídeo.

FIGURA 14: ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$ \* DA FRAÇÃO BB-A12 OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) DO EXTRATO METANÓLICO DA ALGA *Bostrychia binderii*.



\*98,4 ppm: sinal referente ao carbono anomérico (C-1) da molécula de digeneasídeo; 62,9 e 60,9 ppm: sinais referentes aos carbonos C-6 e C'-3, respectivamente.

FIGURA 15: ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  (DEPT-135\*) DO ELUATO AQUOSO (FRAÇÃO BB-A12) OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-CELITE (1:1) DO EXTRATO METANÓLICO DA ALGA *Bostrychia binderii*.

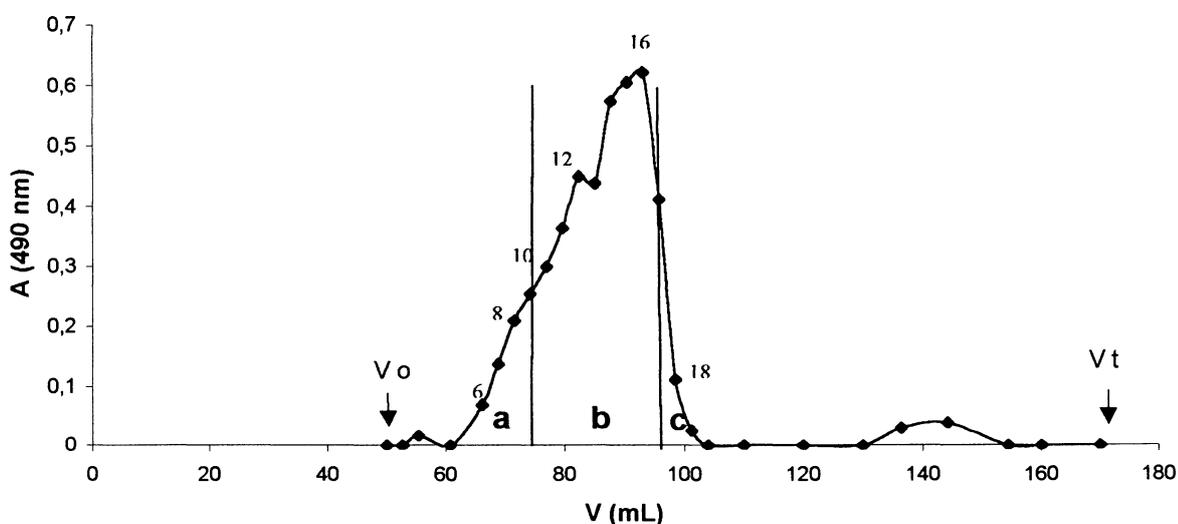


\*62,9 e 60,9 ppm: inversão dos sinais referentes aos carbonos  $\text{CH}_2$ .

Embora os espectros de RMN-<sup>13</sup>C apresentassem principalmente os sinais referentes ao digeneasídeo, as análises por CLAE mostraram a presença de outros componentes na amostra, isto devido a diferença de sensibilidade entre as duas técnicas. Seguiu-se a eluição cromatográfica da coluna de carvão-Celite com concentrações crescentes de etanol (25, 50, 75 e 100%) e as frações obtidas foram reservadas para estudos posteriores.

Com a finalidade de purificar a fração BB-A12 foi realizada uma cromatografia de filtração em Gel (BioGel P-2). O perfil de eluição está apresentado na FIGURA 16. As frações coletadas entre 60 e 100 mL, correspondentes aos tubos 6, 8, 10, 12, 16 e 18 (ver FIGURA 16), foram analisadas por CLAE, e os resultados estão apresentados na FIGURA 17. Com base nesses resultados, onde o tubo 18 (FIGURA 17III) apresenta além do componente com tempo de retenção em 7,85 min, outro em 10,54 min, optou-se por reunir o conteúdo dos tubos 6 a 9; 10 a 17 e 18 a 19, constituindo três frações denominadas de BBP2-a, BBP2-b e BBP2-c, respectivamente.

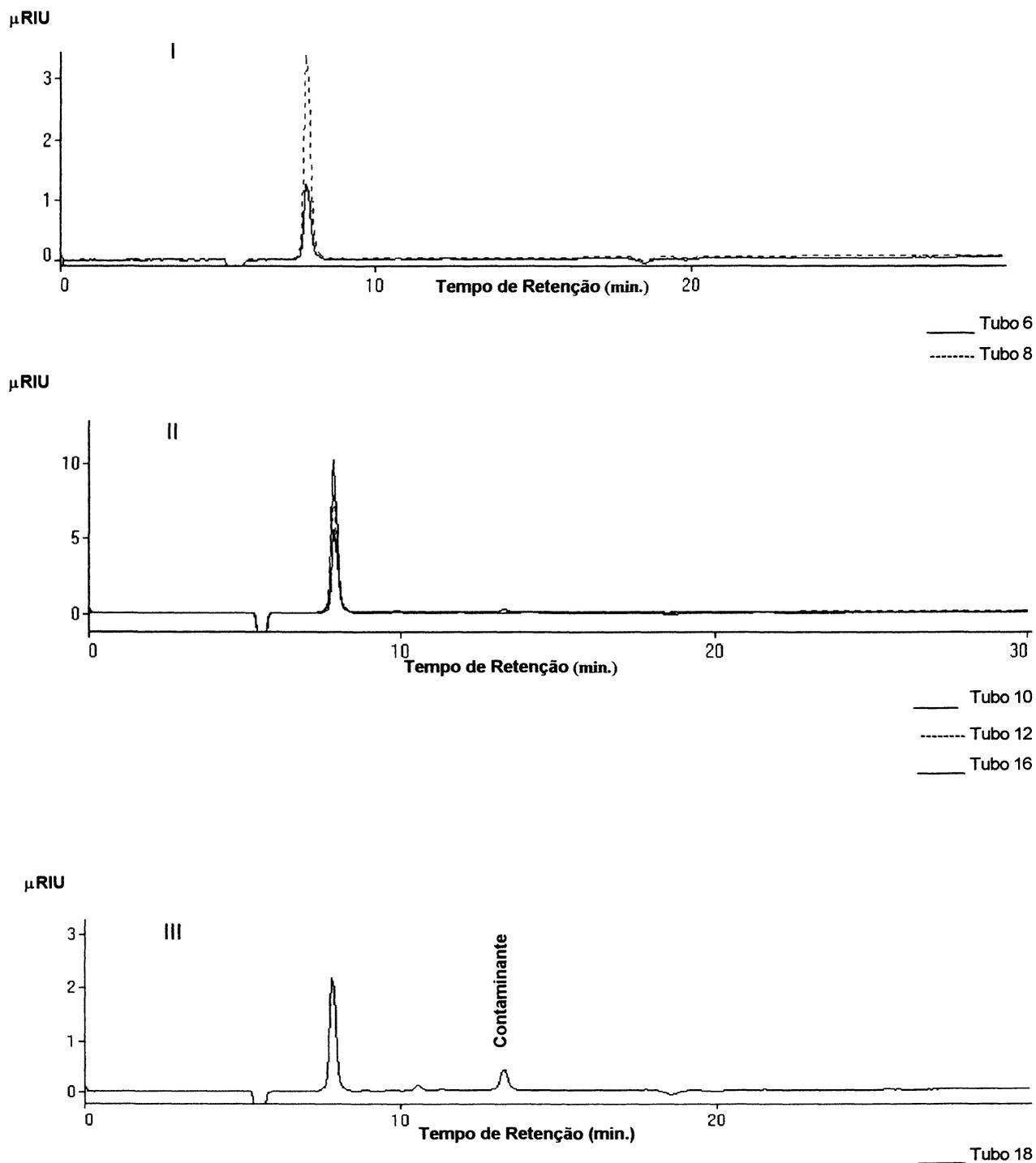
FIGURA 16: PERFIL DE ELUIÇÃO\* DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO EM BIOGEL-P2 DA FRAÇÃO BB-A12 OBTIDA DA ALGA *B. binderii*.



- a** – fração BBP2-a
- b** – fração BBP2-b
- c** – fração BBP2-c

\* Os números no interior do gráfico correspondem ao número dos tubos coletados ( $\Delta V=2,5$  mL).

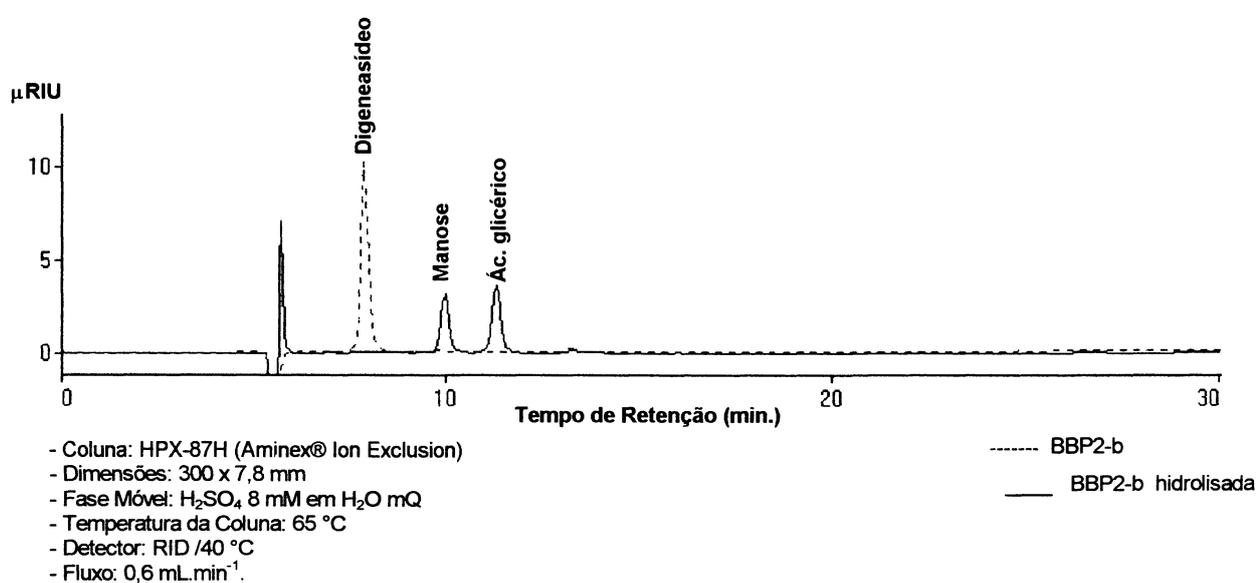
FIGURA 17: ANÁLISE POR CLAE DAS SUBFRAÇÕES CORRESPONDENTES AO PICO PRINCIPAL ELUIDO EM BIOGEL P-2 DA FRAÇÃO BB-A12 (I= TUBOS 6 E 8; II= TUBOS 10, 12 E 16; III= TUBO 18).



- Coluna: HPX-87H (Aminex® Ion Exclusion)
- Dimensões: 300 x 7,8 mm
- Fase Móvel:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  8 mM em  $\text{H}_2\text{O}$  mQ
- Temperatura da Coluna: 65 °C
- Detector: RID /40 °C
- Fluxo: 0,6 mL.min<sup>-1</sup>.

No intuito de provar que o material purificado (fração BBP2-b) tratava-se realmente do componente digeneasídeo, esta amostra foi analisada por ESI-MS (*Electrospray Ionization – Mass Spectroscopy*), RMN-<sup>13</sup>C e CLAE (após hidrólise total). A fração BBP2-b foi submetida a hidrólise com TFA 1M durante 4 h a 100 °C. Após este período, a amostra foi levada a seco em aparelho de *Speed Vac*, ressolubilizada em H<sub>2</sub>O mQ e novamente analisada por CLAE. O cromatograma obtido mostrou a presença de dois picos principais referentes a manose e ácido glicérico, confirmando desta forma a estrutura do digeneasídeo (FIGURA 18).

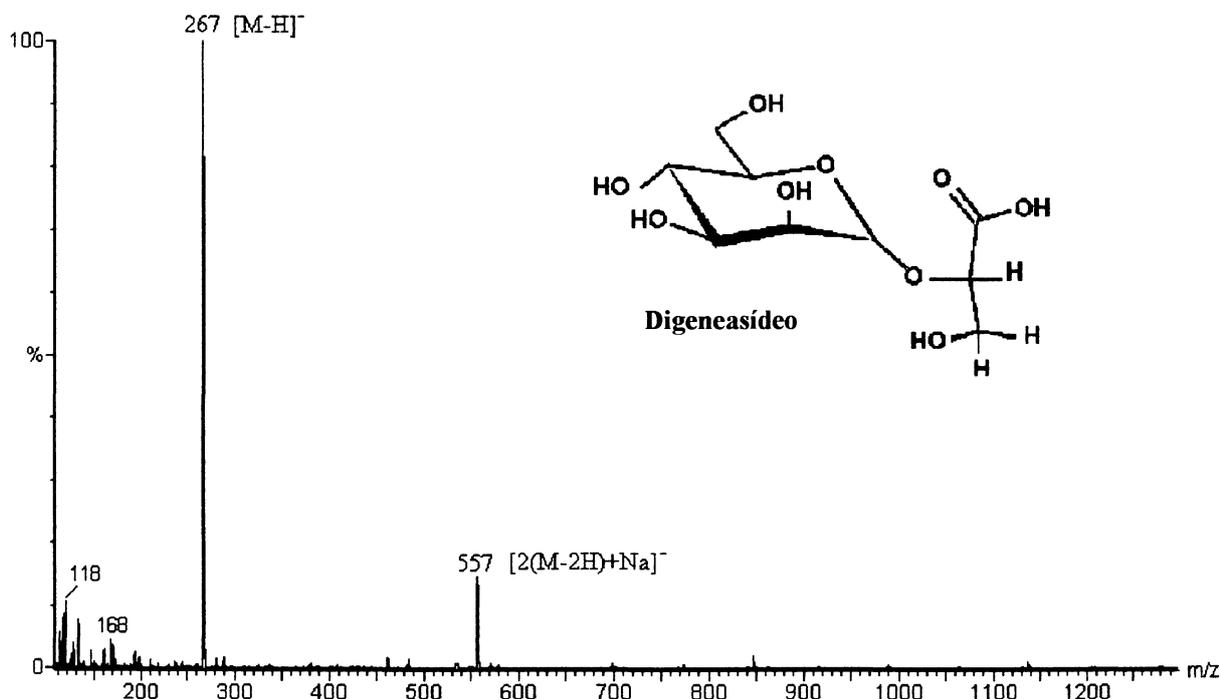
FIGURA 18: ANÁLISE POR CLAE DA FRAÇÃO BBP2-b E DE SEUS PRODUTOS DE HIDRÓLISE .



A análise por espectrometria de massa (ESI-EM) foi realizada no módulo negativo, uma vez que trata-se de uma molécula carregada negativamente. Desta maneira, o espectro de massa obtido apresentou dois íons moleculares principais: 266,96 (≈267) e 557,08 (≈557) *m/z*. A molécula de digeneasídeo apresenta massa molecular, na forma protonada, de 268,16 (≈268). Desta forma, a perda de um próton durante o processo de ionização justifica o fragmento de 266,96. Já o fragmento de 557,08 *m/z* poderia ser justificado pela complexação de duas

moléculas de digeneasídeo desprotonadas, somadas a um íon sódio, os quais somariam uma massa de 557 (FIGURA 19).

FIGURA 19: ESPECTRO DE MASSA DA FRAÇÃO BBP2-B OBTIDO POR ESI-EM DA ALGA *B. binderii*.

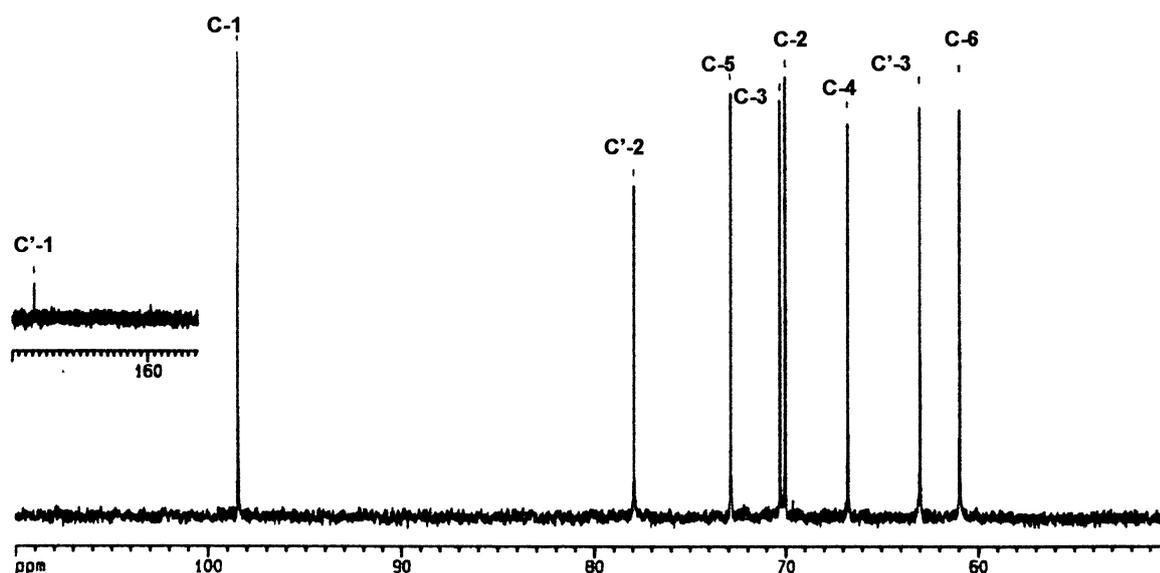


**M = 268,16 (PM Digeneasídeo)**  
**Na = 22,99 PM**

A análise por RMN- $^{13}\text{C}$  da fração BBP2-b mostrou um espectro com 8 sinais principais referentes à molécula de digeneasídeo, porém não era possível a observação do sinal referente ao carbono carboxílico desta molécula ( $\approx 176$  ppm), mesmo com a utilização de pulsos mais longos. KARSTEM, et al. (1994), investigando a presença de digeneasídeo na alga vermelha *Colaglossa leprieurii* (Harvey) J. Agardh (Ceramiales), também era incapaz de observar tal sinal. Este autor propôs que traços de íons paramagnéticos pudessem estar presentes na amostra e, portanto, o sinal do carbono carboxílico estaria sendo mascarado. Para resolver tal problema, o autor fez a adição do agente complexante EDTA, podendo então observar o sinal em 177,7 ppm.

Como o objetivo era a obtenção de uma amostra pura, a adição de EDTA na amostra não era bem vinda. Portanto, a fração BBP2-b foi tratada com uma resina catiônica na forma de sódio, visando a eliminação de possíveis íons paramagnéticos e garantindo a obtenção de um padrão de digeneasídeo na forma de sal de sódio, facilitando sua cristalização e pesagem. O resultado deste procedimento foi o aparecimento de um sinal no espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  em 176,8 ppm, referente ao carbono carboxílico da molécula de digeneasídeo (FIGURA 20). Assim, esta fração passou a ser denominada BBP2-bNa.

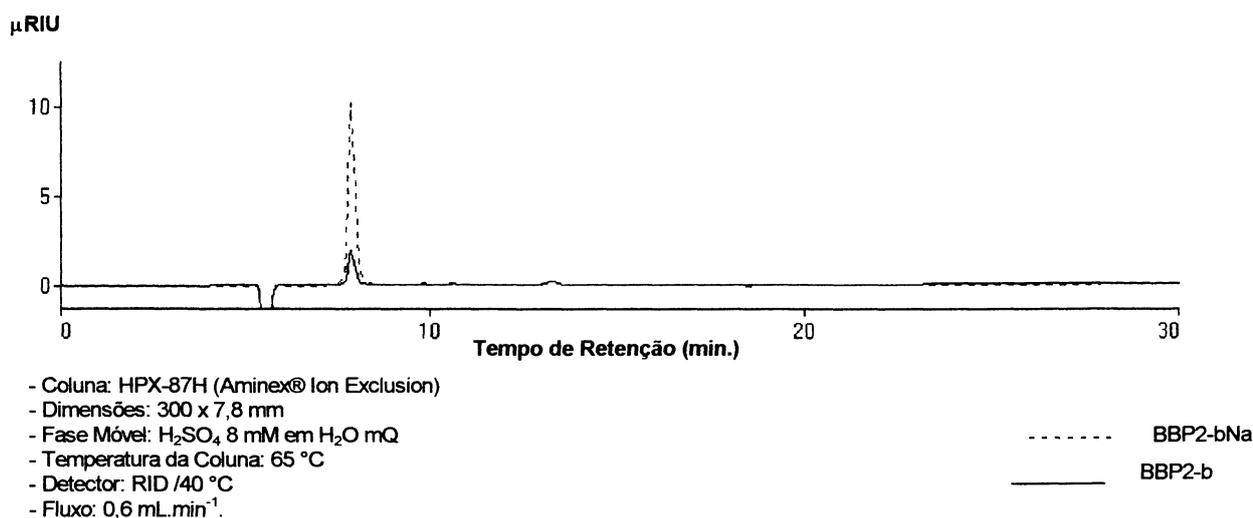
FIGURA 20: ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$ \* DA FRAÇÃO BBP2-b TRATADA COM RESINA CATIÔNICA NA FORMA DE SÓDIO (BBP2-bNa).



\*C'-1= 176,8: sinal referente ao carbono carboxílico da molécula de digeneasídeo.

Uma vez que a fração BBP2-bNa encontrava-se na forma de um sal de sódio, era necessário verificar seu comportamento nas análises por CLAE, comparando seu tempo de retenção com o obtido antes do tratamento daquela fração com resina catiônica (fração BBP2-b). O resultado obtido (FIGURA 21) demonstra que o tempo de retenção é igual para as duas frações. A justificativa para tal fato resulta da utilização de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $8 \text{ mM.L}^{-1}$  como fase móvel (pH 1,0), o que provoca o deslocamento dos íons sódio e conseqüente eluição da molécula na forma protonada durante as análises por CLAE.

FIGURA 21: ANÁLISE POR CLAE\* DAS FRAÇÕES BBP2-bNa E BBP2-b.



\* Sobreposição dos cromatogramas.

#### 4.2.1 RMN bidimensionais da molécula de Digeneasídeo

Para a confirmação dos assinalamentos referentes aos carbonos e hidrogênios da molécula de digeneasídeo, a amostra BBP2-bNa foi submetida a experimentos de RMN mono ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionais (HMQC e COSY).

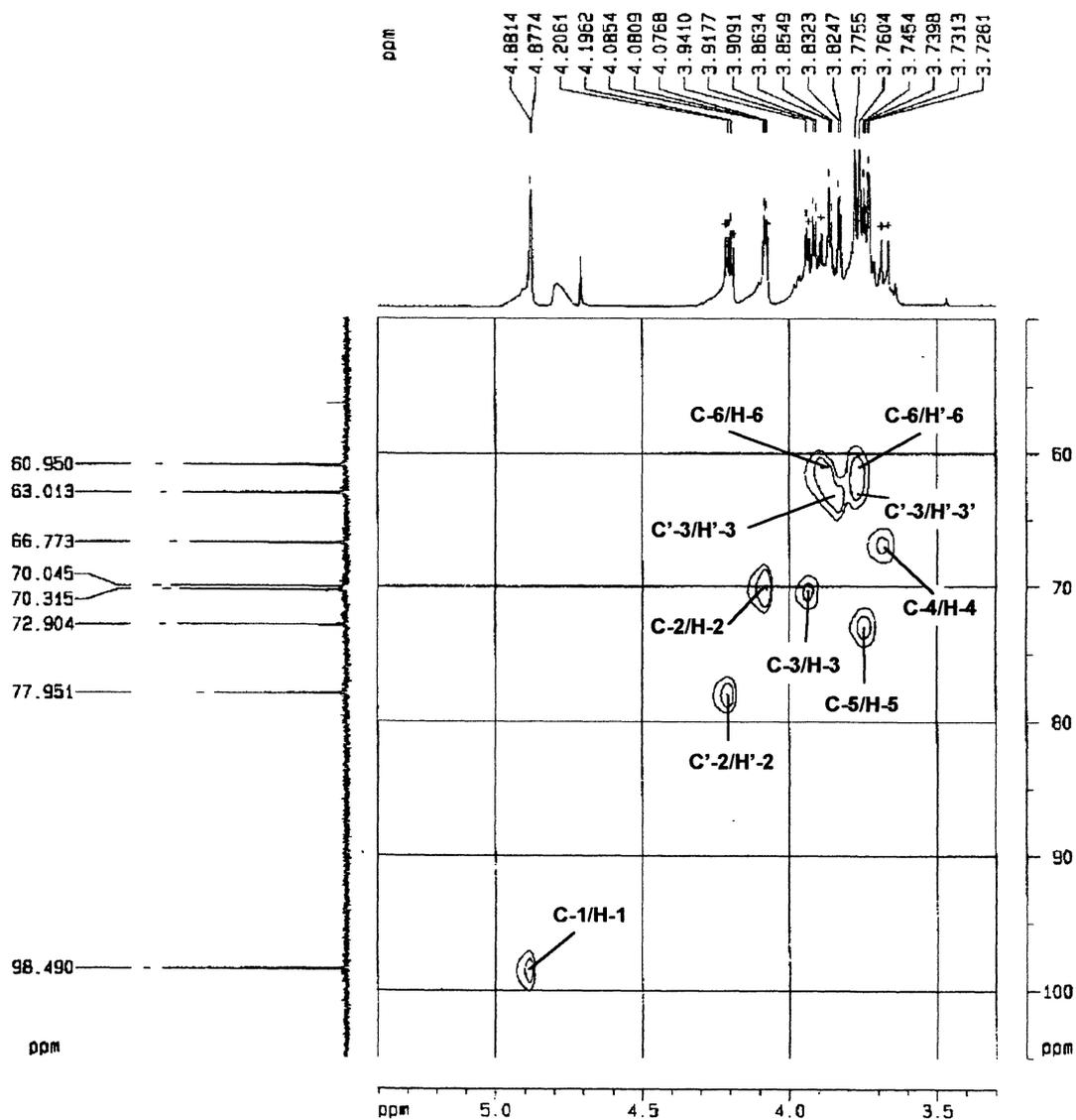
Para um melhor entendimento do processo de interpretação das correlações dos espectros bidimensionais, os carbonos da molécula de digeneasídeo serão referidos como C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6, para o anel  $\alpha$ -D-manopiranosídico, e C'-1, C'-2 e C'-3, referentes ao glicerato ligado. Da mesma maneira, os hidrogênios ligados aos carbonos do anel  $\alpha$ -D-manopiranosídico serão referidos como H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 e H-6', e H'-2, H'-3 e H'-3', referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerato.

Através do experimento de HMQC (FIGURA 22), inicialmente foi possível determinar os deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados a C-1, C-6 e C'-3, previamente assinalados através de RMN- $^{13}\text{C}$  e DEPT, através da correlação C-1/H-1 (98,46/4,88); C-6/H-6 (60,95/3,89); C-6/H-6' (60,95/3,77) e C'-3/H'-3 (62,99/3,83); C'-3/H'-3' (62,99/3,76).

De posse desses assinalamentos, foi realizada a análise do espectro de COSY (FIGURA 23), que possibilitou os assinalamentos dos hidrogênios H-2, H-3, H-4, H'-3, H'-3', através das correlações vicinais H-1/H-2 (4,88/4,08); H-2/H-3 (4,08/3,93); H-3/H-4 (3,93/3,67); H'-2/H'-3 (4,20/3,83) e H'-2/H'-3' (4,20/3,76).

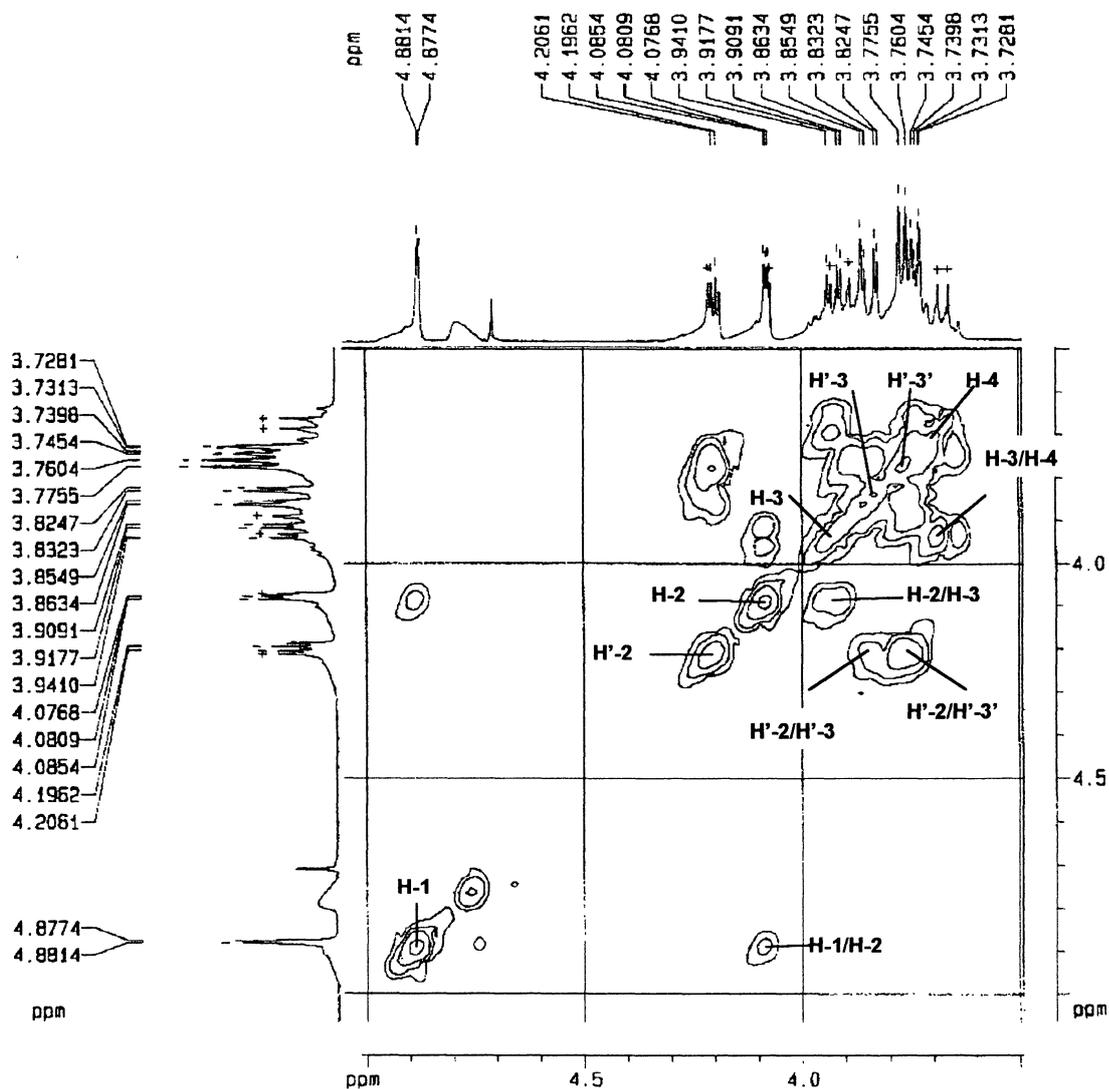
Com as informações obtidas no espectro de COSY, foi possível retornar ao espectro de HMQC e complementar os assinalamentos dos hidrogênios ligados a C-2, C-3, C-4 e C'-3, através das correlações C-2/H-2 (70,04/4,08); C-3/H-3 (70,32/3,93); C-4/H-4 (66,77/3,67); C'-3/H'-3 (62,99/3,83) e C'-3/H'-3' (62,99/3,76). Não foi possível determinar o assinalamento de H-5 através do experimento de COSY, porém, por exclusão, este hidrogênio foi assinalado no espectro de HMQC através da correlação C-5/H-5 (72,90/3,74). Os assinalamentos dos carbonos e hidrogênios referentes a molécula de digeneasídeo estão na TABELA 4.

FIGURA 22: ESPECTRO DE HMQC\* DA FRAÇÃO BBP2-bNa TRATADA COM RESINA CATIÔNICA NA FORMA DE SÓDIO.



\* H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 e H'-6: hidrogênios ligados aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel  $\alpha$ -D-manopiranosídico, respectivamente; H'-2, H'-3 e H'-3': hidrogênios ligados aos carbonos C'-2 e C'-3 da porção glicerato, respectivamente.

FIGURA 23: ESPECTRO DE COSY\* DA FRAÇÃO BBP2-bNa TRATADA COM RESINA CATIÔNICA NA FORMA DE SÓDIO.



\*H-1, H-2, H-3 e H-4: hidrogênios ligados respectivamente aos carbonos 1, 2, 3 e 4 do anel  $\alpha$ -D-manopiranosídico; H'-2, H'-3 e H'-3': hidrogênios ligados respectivamente aos carbonos C'-2 e C'-3 do glicerato ligado.

Quando comparados os assinalamentos de  $^{13}\text{C}$  realizados neste trabalho com os publicados por KARSTEN et al. (1999) (TABELA 2, p. 27) encontrou-se correlações entre a maioria dos sinais, considerando um deslocamento entre +0,9 e 1,0 ppm. Porém, foi possível verificar a inversão dos assinalamentos entre o carbono primário do açúcar (C-6) e do glicerato (C'-3). Os assinalamentos propostos neste trabalho foram confirmados através dos experimentos bidimensionais de HMQC e COSY, discutidos anteriormente.

O assinalamento proposto para o carbono 6 da  $\alpha$ -D-manopirranose está de acordo com o assinalamento de um padrão de metil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo (considerando um deslocamento de +1,2 ppm) publicado por GORIN; MAZUREK (1975).

TABELA 4: ASSINALAMENTO DE RMN- $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}^*$  DO DIGENEASÍDEO (FRAÇÃO BBP2-bNa).

| Carbono correspondente | $^{13}\text{C}$ (ppm) | $^1\text{H}$ (ppm) |
|------------------------|-----------------------|--------------------|
| C-1                    | 98,46                 | 4,88               |
| C-2                    | 70,04                 | 4,08               |
| C-3                    | 70,32                 | 3,93               |
| C-4                    | 66,77                 | 3,67               |
| C-5                    | 72,90                 | 3,74               |
| C-6                    | 60,95                 | 3,77 e 3,89        |
| C'-1                   | 176,85                | -----              |
| C'-2                   | 77,95                 | 4,20               |
| C'-3                   | 62,99                 | 3,76 e 3,83        |

\*Ambos os carbonos C-6 e C'-3 apresentam 2 hidrogênios ligados, enquanto que o carbono C'-1, carbono carboxílico, não possui hidrogênio ligado.

#### 4.2.2 Perfil de eluição da fração BBP2-b em Cromatografia de Filtração em Gel (BIOGEL P-2)

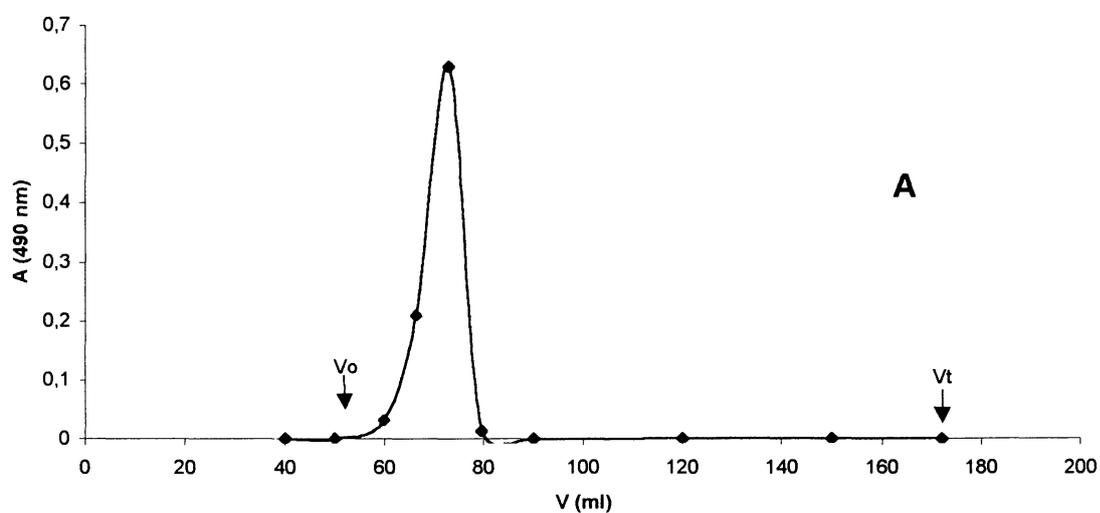
Considerando o limite de exclusão proposto para cromatografia de filtração em gel (BioGel P-2, 1800 a 100 Daltons), e levando-se em conta a massa molecular do digeneasídeo ( $\approx 291$ , como sal de sódio), era de se esperar a eluição deste composto próximo ao volume total da coluna. Porém, seu perfil de eluição (FIGURA 16, p.42) foi próximo ao volume morto da coluna ( $V_0$ ). Este comportamento anormal poderia ser explicado pela formação de agregados entre moléculas de digeneasídeo, aumentando portanto a massa e o raio hidrodinâmico da molécula, modificando seu perfil de eluição em cromatografia de exclusão. Além disso, por tratar-se de uma molécula carregada, não se pode descartar a possibilidade da formação de complexos intermoleculares com cátions presentes na amostra. Nas análises por ESI-MS, o fragmento de  $557,08 m/z$  foi justificado pela complexação de duas moléculas de digeneasídeo desprotonadas, somadas a um íon sódio. Esta hipótese poderia ajudar na explicação do comportamento anormal desta molécula durante a cromatografia de filtração em gel, a qual apresentou um perfil de eluição não compatível com sua massa molecular, quando eluída a pH 6,5.

Na tentativa de provar a hipótese de formação de complexos entre as moléculas de digeneasídeo e cátions, foi realizada uma nova cromatografia de filtração em gel (BioGel P-2). Porém, o eluente ( $H_2O$  mQ) foi tratado com ácido clorídrico 1 M até pH 2,5, com o objetivo de protonar a molécula de digeneasídeo, impedindo a formação de complexos com cátions.

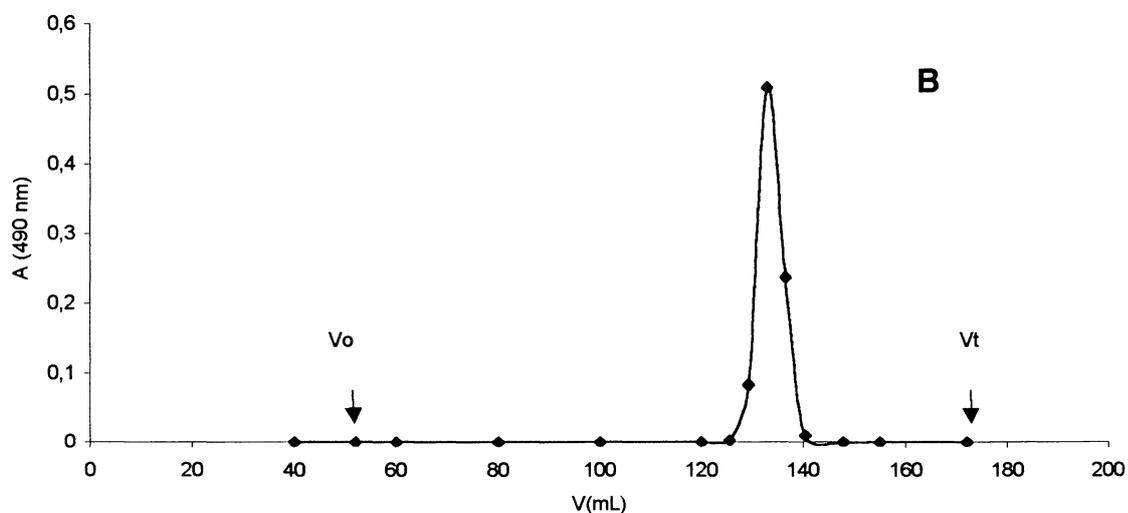
Para este experimento foram utilizados 12 mg da fração BBP-2b, a qual apresentou um volume de eluição entre 60 a 80 mL em pH 6,51 (FIGURA 24A). Quando submetida à nova cromatografia em pH 2,5, o volume de eluição desta mesma amostra passou para 125 a 140 mL (FIGURA 24B). Este novo perfil de eluição da amostra em pH 2,51 está dentro do esperado para a faixa de exclusão do gel (1800-100 Daltons), sendo portanto compatível com a massa molecular do digeneasídeo. Este resultado indica que há formação de complexos entre as moléculas de digeneasídeo, provavelmente entre o grupo carboxílico do glicerato e cátions divalentes.

Com base nos resultados apresentados acima, a fração BBP2-b obtida da alga *B. binderii* foi considerada como constituída pelo heterosídeo digeneasídeo. A obtenção desta amostra purificada foi ainda importante devido a sua utilização como padrão para identificação de digeneasídeo em outras espécies de algas, bem como para construção de uma curva de calibração (padronização externa) para análises por CLAE, possibilitando a quantificação deste heterosídeo em outras amostras investigadas.

FIGURA 24: PERFIL DE ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL (BIOGEL P-2) DA FRAÇÃO BBP-2b UTILIZANDO ELUENTE (H<sub>2</sub>O) EM DIFERENTES pH\*.



\* Perfil de eluição da fração BBP-2b em BioGel P-2 utilizando como eluente H<sub>2</sub>O pH 6,5; digeneasídeo eluindo próximo ao V<sub>0</sub> da coluna.



\* Perfil de eluição da fração BBP-2b em BioGel P-2 utilizando como eluente H<sub>2</sub>O pH 2,5, acidificada com HCl 1N; digeneasídeo eluindo próximo ao V<sub>t</sub> da coluna.

### 4.3 PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES POR CLAE

Durante o processo de purificação e caracterização dos padrões de floridosídeo e digeneasídeo foram utilizadas duas colunas para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo: HPX-87H (AMINEX® Ion Exclusion) e REZEX RPM-Monosaccharide. Ambas possuem como fase estacionária o co-polímero de estireno divinilbenzeno sulfonado, porém a primeira possui como cátion trocador o hidrogênio (forma  $H^+$ ) e a segunda o chumbo ( $Pb^+$ ). Como um dos propósitos deste estudo é a quantificação de heterosídeos via CLAE, as condições ideais de análises seriam aquelas que permitissem tal objetivo em uma única análise, com eficiência cromatográfica e uma boa resolução entre os compostos de interesse.

A eficiência de um sistema cromatográfico convencional é determinada a partir da somatória das características individuais dos fatores relacionados ao empacotamento e composição da fase estacionária da coluna, onde cada termo influencia na eficiência como fator isolado e, a somatória destes fatores define a eficiência do sistema como um todo. Uma maneira de se expressar a eficiência cromatográfica de um sistema é através da equação de van Deemter ( $H = A + B/\mu + C\mu$ ). O fator A, está relacionado com o “recheio” da coluna, onde as características físico-químicas do material utilizado define a resistência oferecida pelo sistema à amostra/fase móvel. Esta resistência está relacionada ao tamanho da partícula, sua porosidade, composição química e também pelo grau de empacotamento da coluna. O segundo fator ( $B/\mu$ ) está relacionado com a difusão da amostra ao longo da coluna, ou seja, o percentual de distribuição da amostra entre a fase estacionária e a fase móvel (razão de distribuição das massas). O último fator relaciona a transferência de massa através da coluna (difusão axial) e esta intimamente relacionado aos fatores anterior (A e  $B/\mu$ ) (NEUE, 1997).

Durante a purificação do floridosídeo (item 4.1), foi possível detectar via RMN- $^{13}C$  a presença de ambos os heterosídeos (digeneasídeo e floridosídeo) no extrato etanólico da alga *Acanthophora spicifera* (FIGURA 3). Uma vez que os padrões desses glicosídeos foram obtidos, como descrito anteriormente, foi

realizada uma análise comparativa entre a eficiência cromatográfica para estes compostos em relação às colunas citadas acima.

A alga *A. spicifera* (12,0 mg alga seca e moída) foi submetida a uma extração quantitativa como descrito no 3.2.2. Após esta extração, 50  $\mu$ L do sobrenadante etanólico foi levado a seco e solubilizado em 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ e analisado por CLAE utilizando as diferentes colunas.

Os resultados obtidos mostram que a coluna REZEX RPM-monosaccharide (FIGURA 26A) apresentou interação com a fase estacionária apenas para o heterosídeo floridosídeo (TR= 15,83 min), permitindo que outros compostos (incluindo digeneasídeo) fossem eluídos no volume morto da coluna (componentes não retidos). Portanto, de acordo com a equação comentada acima, o fator  $C_{\mu}$  (razão de distribuição das massas) é o termo com efeito negativo para o componente digeneasídeo nas análises utilizando esta coluna, uma vez que o tempo em que as moléculas deste soluto permanecem na fase móvel é igual ao tempo gasto para as moléculas de fase móvel percorrerem a coluna ( $V_0$ ).

O cromatograma obtido para a coluna HPX-87H (FIGURA 26B) mostrou a presença de três picos principais, com tempos de retenção em 7,85, 9,53 e 10,78 min, onde os dois primeiros são compatíveis com os tempos de retenção de padrões autênticos de digeneasídeo e floridosídeo, respectivamente. Esta coluna apresentou uma maior eficiência cromatográfica quando comparada com a coluna Rezex RPM-monosaccharide, uma vez que evidencia a presença de pelo menos três componentes na amostra, sendo dois deles o floridosídeo e digeneasídeo. Outrossim, todos os componentes da amostra possuem tempo de retenção superior ao  $V_0$  desta coluna (detectado pelo pico negativo, o qual se refere a água), evidenciando a interação com a fase estacionária. Além disso, o cromatograma obtido permitiu verificar uma significativa diferença entre os tempos de retenção dos heterosídeos digeneasídeo (TR = 7,83 min) e floridosídeo (TR = 9,53 min), o que reflete na resolução entre os componentes de interesse. As condições de análises a que foram submetidas as amostras para ambas as colunas (fase móvel, temperatura e fluxo) são aquelas recomendadas pelos fabricantes e estão discriminadas no pé das figuras de cada cromatograma.

Outro fator de grande importância nas análises cromatográficas quantitativas é o sistema de detecção. Nas análises por CLAE, as propriedades físicas ou físico-químicas da amostra e fase móvel são, muitas vezes, similares, acarretando em dificuldades nos sistema de detecção para este tipo de cromatografia. Na tentativa de solucionar este problema, tem se desenvolvido sistemas de detecção que permitam medidas diferenciadas das propriedades gerais da fase móvel e amostra ou ainda detecção após a eliminação da fase móvel.

Uma série de detectores têm sido desenvolvidos para CLAE, baseados em uma das soluções citadas acima. Um detector ideal para CLAE seria aquele com as seguintes características: alta sensibilidade e baixo limite de detecção; resposta rápida a todos os solutos; resposta independente da fase móvel; insensibilidade a mudanças de temperatura, vazão e composição da fase móvel; resposta que aumente linearmente com a concentração do soluto; não destruição do soluto; e informações qualitativas do pico desejado (COLLINS; BRAGA, 1987).

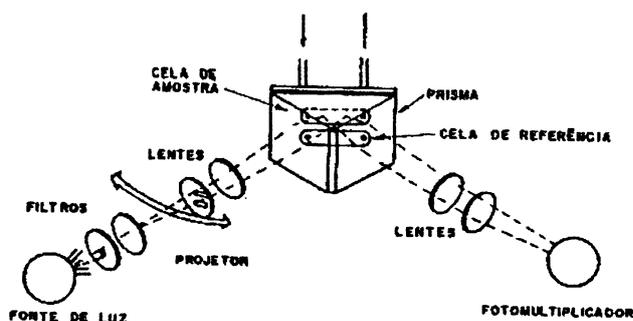
Atualmente, os detectores não são versáteis, ou universais, nem apresentam todas as opções desejadas. Contudo, existem detectores que oferecem ampla faixa de aplicação e raramente o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência é comprometido pelo detector. Se os componentes da amostra são desiguais e diferem totalmente em suas características físico-químicas, pode ser necessária a utilização de 2 ou mais detectores em série para assegurar que cada componente de interesse seja medido adequadamente. Um detector pode ser seletivo ou universal, segundo a sua capacidade de trabalhar com um só tipo de amostra específica ou com todos os tipos de amostra. Em geral, os detectores universais são os mais utilizados, principalmente nos laboratórios de pesquisa onde se trabalha com diferentes tipos de amostra. Os seletivos, que podem ser mais sensíveis e efetuam melhor análises de amostras complexas, têm grande interesse em laboratórios que efetuam análises de rotina (COLLINS; BRAGA, 1987).

A sensibilidade de um detector é considerada como a relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera este sinal. Este é um termo relativo, uma vez que o sinal obtido por um mesmo detector pode ser muito diferente para diversas amostras. A linearidade é a faixa onde o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração do soluto, sendo de grande importância em análises

quantitativas. O limite mínimo de detecção é a menor quantidade de substância que pode ser detectada, produzindo um sinal igual ao dobro do nível do ruído do instrumento, sendo o ruído a variação no sinal do instrumento que não é atribuído à amostra e que pode ser produzido por falhas eletrônicas, temperatura, e variações na composição (gradiente) e vazão da fase móvel (COLLINS; BRAGA, 1987).

Devido às características físico-químicas dos compostos de interesse que estão sendo avaliados neste trabalho, o detector utilizado nas análises foi o detector de índice de refração (RID) do tipo Fresnel. Este detector é o segundo mais usado em CLAE. Sua detecção está baseada no acompanhamento contínuo da diferença no índice de refração entre a fase móvel pura (cela de referência) e o eluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra (cela de detecção). Para os solutos que não absorvem no UV ou visível e conseqüentemente não são detectados pelos espectrofotômetros, a melhor escolha é o detector de índice de refração. A resposta deste detector é universal e sua sensibilidade é moderada, geralmente da ordem de microgramas ( $10^{-6}$  g). Este nível de concentração corresponde a uma diferença de aproximadamente  $10^{-7}$  unidades de índice de refração. Esta detecção está baseada na lei de Fresnel, onde na interface entre o prisma de vidro e algum líquido, a quantidade de luz transmitida e refletida é proporcional ao ângulo de incidência da luz e ao índice de refração do líquido (FIGURA 25) (COLLINS; BRAGA, 1987).

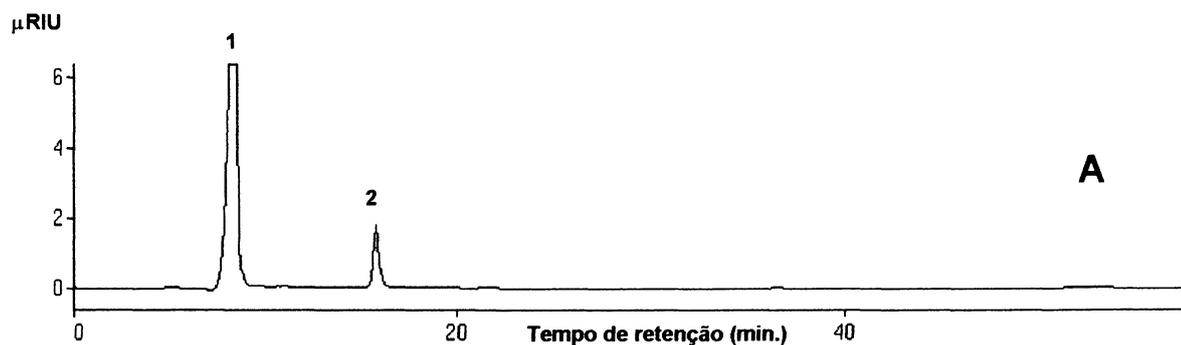
FIGURA 25: ESQUEMA DE UM DETECTOR REFRAATOMÉTRICO DO TIPO FRESNEL.



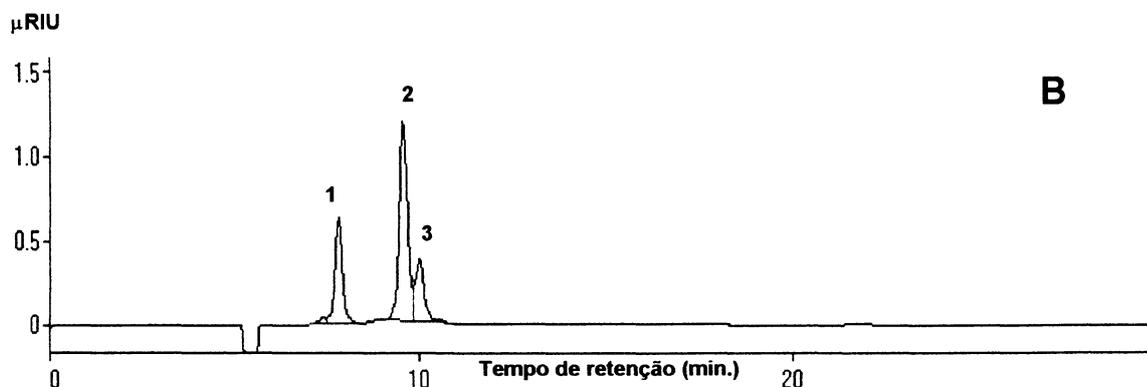
Fonte: COLLINS; BRAGA, 1987.

Tendo sido estabelecido os parâmetros das análises por cromatografia líquida de alta eficiência, foram realizadas curvas de calibração para quantificação dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo via CLAE, a partir dos padrões obtidos.

FIGURA 26: ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICIÊNCIA CROMATOGRÁFICA ENTRE AS COLUNAS REZEX RPM-MONOSACCHARIDE E HPX-87H, PARA A SEPARAÇÃO DOS HETEROSÍDEOS FLORIDOSÍDEO E DIGENEASÍDEO NO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *Acanthophora spicifera*.



- Coluna: REZEX RPM Monosaccharide
- Dimensões: 300 x 7.8 mm
- Pré-coluna: REZEX RPM Monosaccharide
- Fase Móvel: H<sub>2</sub>O mQ.
- Temperatura da coluna: 80 °C;
- Detector: RID/40 °C.
- Fluxo: 0,55 mL.min<sup>-1</sup>.

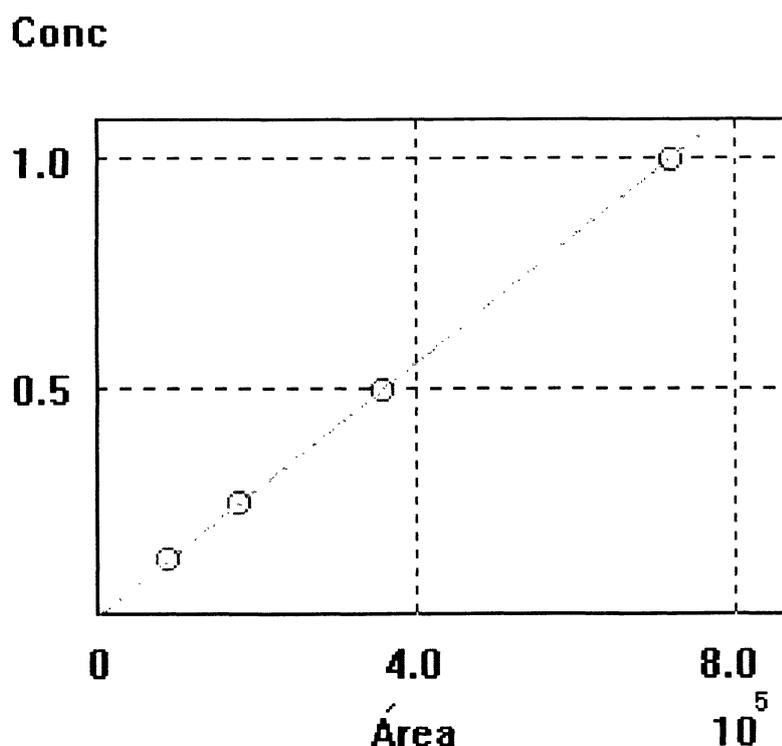


- Coluna: HPX-87H (Aminex® Ion Exclusion)
- Dimensões: 300 x 7,8 mm
- Fase Móvel: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 mM em H<sub>2</sub>O mQ
- Temperatura da Coluna: 65 °C
- Detector: RID /40 °C
- Fluxo: 0,6 mL.min<sup>-1</sup>.

#### 4.3.1 Curvas de calibração em CLAE para os heterosídeos Floridosídeo e Digeneasídeo

Foram pesados 5 mg do padrão de floridosídeo obtido da alga *A. spicifera*, solubilizado em H<sub>2</sub>O mQ em balão volumétrico de 5 mL, obtendo-se um padrão na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. A partir deste padrão (solução estoque), foram realizadas diluições as quais originaram padrões de floridosídeo nas concentrações de 0,500, 0,250 e 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>. Foram realizadas injeções separadas destes padrões de floridosídeo em CLAE, utilizando a coluna HPX-87H e detector RID. A partir dos cromatogramas obtidos, foi gerado um gráfico área (pico do cromatograma) *versus* a concentração do padrão (FIGURA 27).

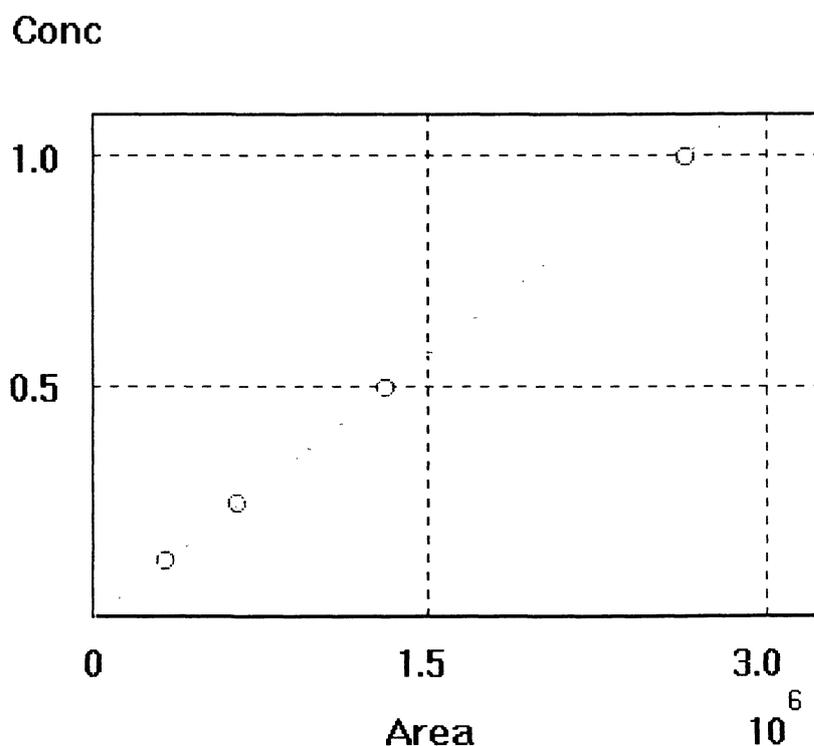
FIGURA 27: CURVA DE CALIBRAÇÃO\* EM CLAE PARA FLORIDOSÍDEO



\* Concentração de padrões em mg.mL<sup>-1</sup>; área em unidades de área (U.A.).

Da mesma maneira que para o floridosídeo, foram pesados 5 mg do padrão de digeneasídeo obtido a partir da alga *B. binderii* e solubilizadas em H<sub>2</sub>O mQ em balão volumétrico de 5 mL, obtendo-se um padrão na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. A partir deste padrão (solução estoque), foram realizadas diluições, as quais originaram padrões de digeneasídeo nas concentrações de 0,500, 0,250 e 0,125 mgmL<sup>-1</sup>. Foram realizadas injeções separadas destes padrões de digeneasídeo em CLAE, utilizando a coluna HPX-87H e detector RID. A partir dos cromatogramas obtidos, foi gerado um gráfico área (pico do cromatograma) versus concentração do padrão (FIGURA 28).

FIGURA 28: CURVA DE CALIBRAÇÃO\* EM CLAE PARA DIGENEASÍDEO



\* Concentração de padrões em mg.mL<sup>-1</sup>; área em unidades de área (U.A.).

Os resultados obtidos para as curvas de calibração tanto do floridosídeo quanto do digeneasídeo mostraram-se linear para faixa de concentração proposta (0,125 a 1 mg.mL<sup>-1</sup>), indicando uma resposta do detector diretamente proporcional à concentração da amostra.

Destaca-se também a diferença no fator de resposta do detector para os diferentes heterosídeos. Concentrações idênticas dos padrões de floridosídeo e digeneasídeo produzem respostas diferentes ao detector por índice refratométrico (RID). O sinal gerado pelo detector por um padrão de floridosídeo na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> corresponde a uma área de aproximadamente  $8 \times 10^5$  U.A (unidades de área; FIGURA 27), enquanto que o sinal gerado por um padrão de digeneasídeo na mesma concentração corresponde a aproximadamente  $3 \times 10^6$  U.A (FIGURA 28). Essa diferença no fator de resposta evidencia a importância da realização de uma curva de calibração para cada um dos analitos de interesse em análises quantitativas, mesmo se tratando de moléculas com certa semelhança estrutural.

Utilizando-se as curvas de calibração, foi possível realizar a quantificação de ambos heterosídeos nas diferentes espécies de algas, permitindo a obtenção de resultados fidedignos nas análises quantitativas por cromatografia líquida de alta eficiência.

## 5 EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM DE TRÊS GRUPOS DE ALGAS VERMELHAS (Rhodophyta)

A divisão Rhodophyta representa um dos mais antigos grupos de algas eucarióticas, apresentando apenas uma única classe, Rhodophyceae, que se divide em duas subclasses Bangioideae e Florideae. A subclasse Florideae é representada por várias ordens, dentre os quais daremos destaque a algumas espécies pertencentes às ordens Ceramiales, Gracilariales e Nemaliales.

Os estudos publicados sobre carboidratos de baixa massa molecular (CBMM) de algas pertencentes à ordem Ceramiales tem levado a resultados conflitantes, no que diz respeito a presença ou ausência desses heterosídeos em algumas espécies.

KREMER; VOLG (1974) estudando os produtos fotossintéticos de várias espécies de Rhodophyta pela técnica de incorporação de  $^{14}\text{C}$  ( $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ ) através da fotossíntese, encontrou a presença de digeneasídeo somente em espécies da ordem Ceramiales, sugerindo o uso deste heterosídeo na classificação quimiotaxonômica de algas pertencentes a esta ordem.

KIRST (1980), estudando a influência da concentração de íons ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) na biossíntese dos CBMM em várias espécies de Rhodophyta, também detectou a presença do heterosídeo digeneasídeo apenas nas espécies pertencentes a ordem Ceramiales, reforçando os dados publicados por KREMER; VOLG (1974).

KREMER; VOLG (1974), utilizaram para a detecção do digeneasídeo a cromatografia em camada delgada (CCD) visualizada por autoradiografia, enquanto que KIRST (1980) evidenciou a presença do digeneasídeo através da hidrólise ácida deste heterosídeo e posterior dosagem do ácido glicérico liberado. A dosagem do ácido glicérico foi realizada por oxidação a ácido hidroxipirúvico pela enzima ácido glicérico desidrogenase e coenzima  $\text{NAD}^+$ , propondo uma técnica qualitativa e quantitativa.

Apesar destas considerações sobre o heterosídeo digeneasídeo, tem-se demonstrado que alguns gêneros da ordem Ceramiales (*Laurencia* e gêneros relacionados) produzem e acumulam floridosídeo e não digeneasídeo (BARROW et al., 1995).

BARROW et al. (1995), realizaram um inventário de 22 espécies de *Laurencia* e apenas o heterosídeo floridosídeo foi detectado. Os resultados publicados por estes autores foram baseados em análises utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e cromatografia gasosa e atribuem os resultados publicados por KREMER; VOLG (1974) e KIRST (1980) à utilização de técnicas impróprias para este tipo de análise. Além disso, concluem que se o heterosídeo digeneasídeo estivesse presente nas espécies de algas por eles estudadas, estaria em concentrações entre 0,05 e 0,1% do floridosídeo, propondo uma revisão sobre a utilização deste heterosídeo como marcador quimiotaxonômico da ordem Ceramiales.

Diante dos resultados publicados e, devido a importância destes heterosídeos como produtos fotossintéticos, realizou-se uma investigação qualitativa e quantitativa destes compostos em algumas espécies de algas vermelhas (Rhodophyta).

Foram selecionadas para este trabalho 10 espécies de algas vermelhas, sendo 8 delas pertencentes a ordem Ceramiales, 1 a ordem Gracilariales e a última da ordem Nemaliales. Estas algas foram divididas em três grupos com base na proximidade da ordem e gênero aos quais pertencem:

- grupo A: complexo *Laurencia* (*Chondrophyucus*; *Laurencia*);
- grupo B: gêneros *Acanthophora* e *Polysiphonia*;
- grupo C: ordens Gracilariales e Nemaliales.

Para o grupo A, foram selecionadas dentro da ordem Ceramiales, quatro espécies do gênero *Laurencia* (*L. arbuscula* Sonder; *L. clavata* Sonder; *L. filiformis* (C. Agardh) Montagne; *L. furcata* Cordeiro-Marino & Fujii) e duas espécies do gênero *Chondrophyucus* (*C. flagellifera* J. Agardh e *C. translucida* Fujii & Cordeiro-Marino). Dentre estas espécies, *L. arbuscula*, *L. filiformis*, *L. furcata* e *C. flagellifera* (antiga *L. flagellifera*) são as mesmas espécies estudadas por BARROW et al. (1995), sendo, inclusive, cedidas pela mesma pesquisadora (M. Fujii, Instituto de Botânica de São Paulo). Já os esquemas de extração foram os mesmos utilizados por KARSTEN et al. (1991).

O grupo B foi também formado por espécies da ordem Ceramiales, sendo elas *Acanthophora spicifera* (M. Vahl) Borisen e *Polysiphonia* sp Greville.

O grupo C é composto por duas espécies, a primeira pertencente à ordem

Gracilariales (*Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh) e a segunda pertencente a ordem Nemaliales (*Tricleocarpa cylindrica* (J. Ellis & Solander) Huisman & Borowitzka).

As espécies de algas vermelhas foram submetidas a diferentes técnicas analíticas, de caráter qualitativo e quantitativo, para estudar os heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, além da quantificação dos principais cátions presentes em cada espécie ( $\text{Na}^+$ ;  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ).

As análises qualitativas foram realizadas baseadas em técnicas de RMN- $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , comparando a presença ou ausências de sinais referentes aos heterosídeos digeneasídeo e floridosídeo. Já as análises quantitativas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, comparando o tempo de retenção dos componentes presentes nas amostras com o tempo de retenção de padrões autênticos, utilizando as curvas de calibração de cada heterosídeo como referência para a quantificação.

## 5.1 EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM EM ALGUMAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *Laurencia* (GRUPO A)

Dentre as 10 espécies de algas selecionadas para este trabalho, 6 delas (grupo A) são pertencentes ao complexo *Laurencia*. Este complexo engloba cerca de 150 espécies de algas distribuídas entre os gêneros *Laurencia*, *Chondrophycus* e *Osmundea* (Rhodophyta, Ceramiales). Porém, somente espécies dos gêneros *Laurencia* e *Chondrophycus* foram estudadas neste trabalho de tese.

As algas *L. arbuscula*; *L. furcata*; *C. flagellifera* foram coletadas na praia Pedra do Xarçú-Cabo, enquanto que *L. filiformis* e *C. translucida* na praia de Boa Viagem, ambas em Recife-PE. Já *L. clavata*, foi coletada no litoral de Santa Catarina, na praia de Bombinhas.

Para as análises de identificação e caracterização química dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, essas espécies foram submetidas a extração etanólica qualitativa (item 3.2 ESQUEMA 1) segundo KASTEN et al. (1991). Foram realizadas análises de RMN-<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H para todas as espécies em questão, avaliando a presença dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, os quais foram evidenciados pelos sinais referentes ao carbono e próton anomérico de cada componente.

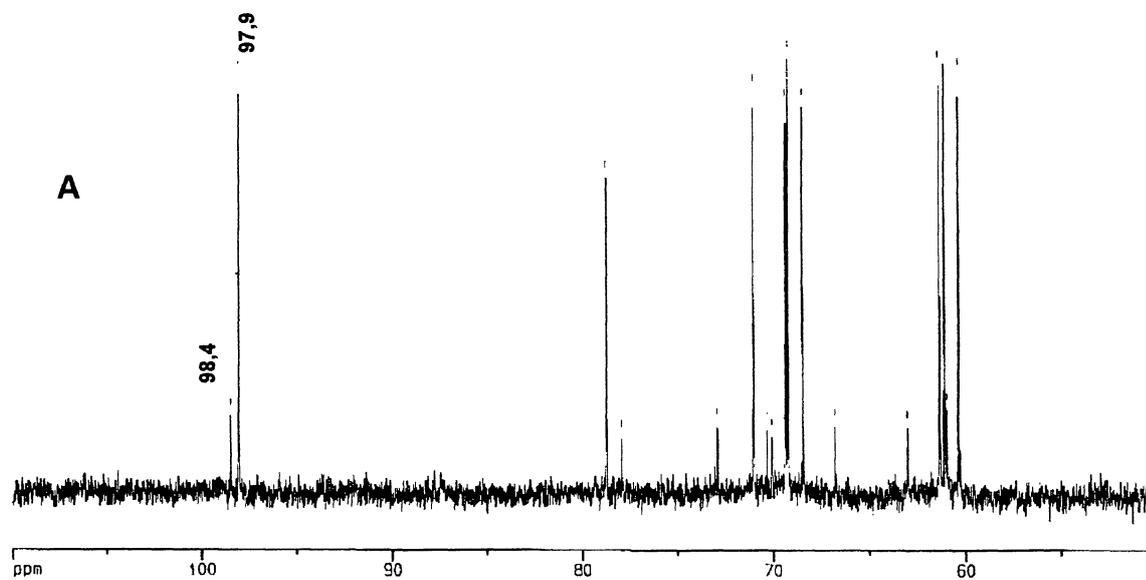
### 5.1.1 Análises de RMN-<sup>13</sup>C e RMN-<sup>1</sup>H das algas pertencentes ao complexo *Laurencia* (GRUPO A).

Através das análises de RMN-<sup>13</sup>C foi possível detectar a presença do heterosídeo floridosídeo (C-1 97,8 ppm) em todas as espécies deste grupo. Através desta técnica, a presença do digeneasídeo (C-1 98,4 ppm) foi detectada apenas nas espécies *L. furcata* (FIGURA 29A) e *C. flagellifera* (FIGURA 30A). Os espectros de RMN-<sup>13</sup>C das extrações etanólicas de *L. clavata* (FIGURA 31A), *L. filiformis* (FIGURA 32A) e *C. translucida* (FIGURA 33A) apresentaram sinais de baixa intensidade, os quais podem ser confundidos com variações da linha de base.

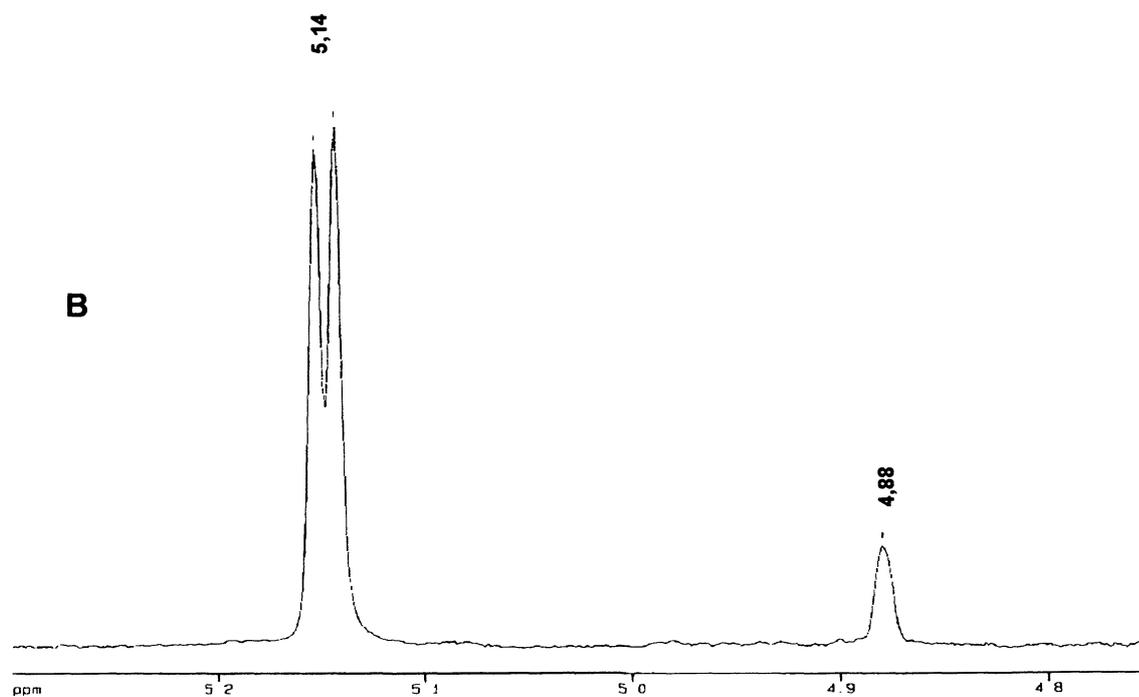
Portanto, para estas espécies as análises de RMN-<sup>13</sup>C não foram conclusivas a respeito da presença do heterosídeo digeneasídeo. A análise de RMN-<sup>13</sup>C de *L. arbuscula* (FIGURA 34A) também não apresentou sinais, mesmo de baixa intensidade, do heterosídeo digeneasídeo.

No entanto, quando submetidas à análises de RMN-<sup>1</sup>H, além da presença do heterosídeo floridosídeo em todas as espécies deste grupo (H-1 5,14 ppm), foi confirmada a presença de digeneasídeo (H-1 4,88 ppm) em *L. clavata* (FIGURA 31B), *L. filiformis* (FIGURA 32B), *L. furcata* (FIGURA 29B), *C. flagellifera* (FIGURA 30B) e *C. trasnslucida* (FIGURA 33B). A análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da alga *L. arbuscula* (FIGURA 34B), que não apresentava sinais referentes ao digeneasídeo via RMN-<sup>13</sup>C, mostrou-se indeterminado quanto à presença deste composto.

FIGURA 29: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}$ \* (A) E  $^1\text{H}$ \* (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *L. furcata*.

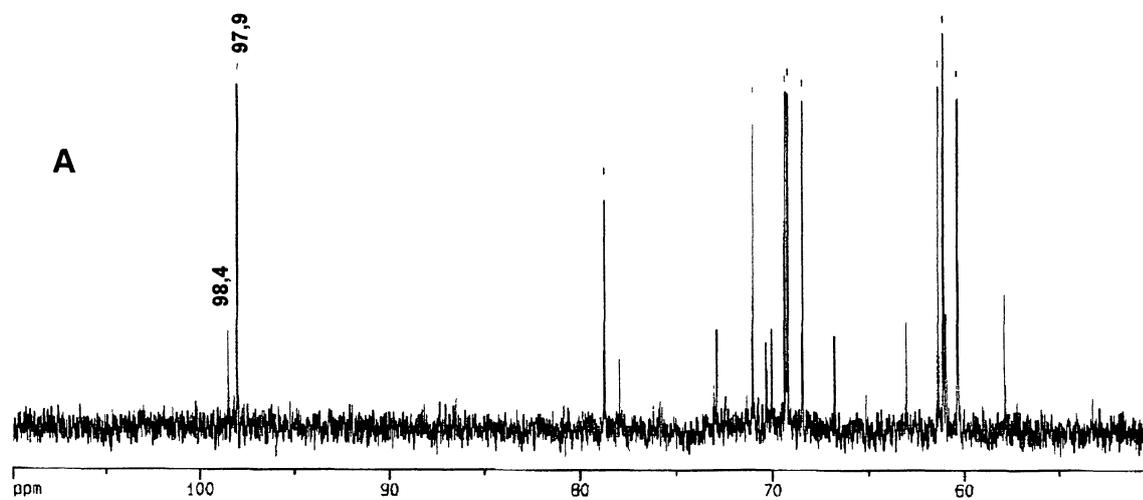


\* RMN- $^{13}\text{C}$ : 98,4 ppm: C-1 digeneasídeo; 97,9 ppm: C-1 floridosídeo.

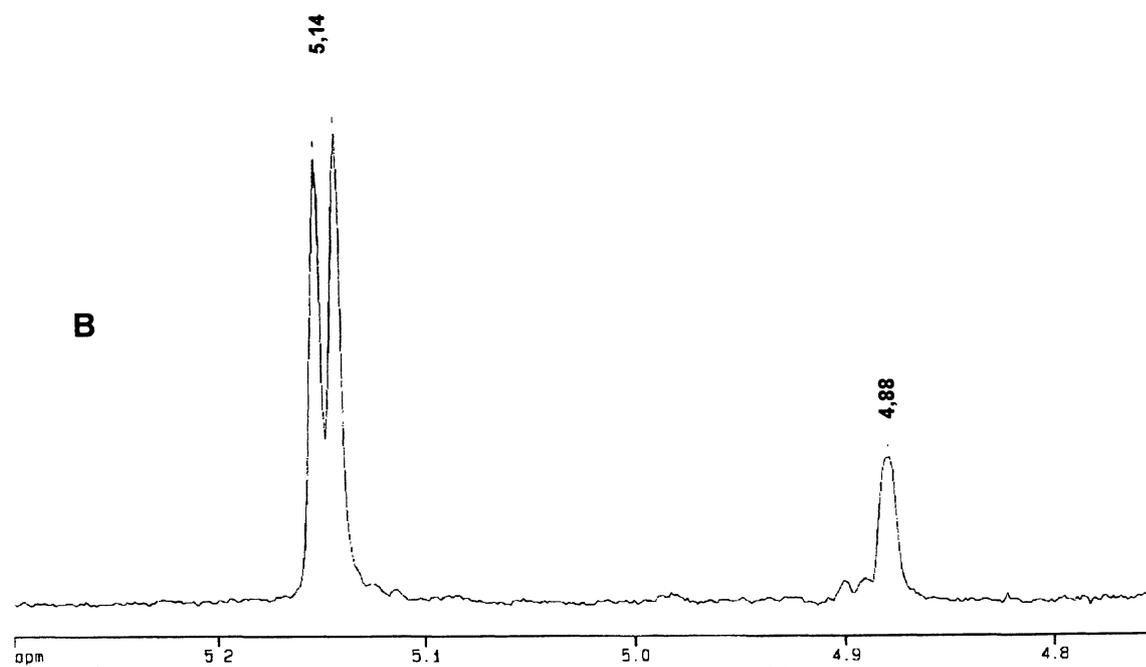


\* 5,14 ppm: H-1 floridosídeo; 4,88 ppm: H-1 digeneasídeo.

FIGURA 30: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}^*$  (A) E  $^1\text{H}$  (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *C. flagellifera*.

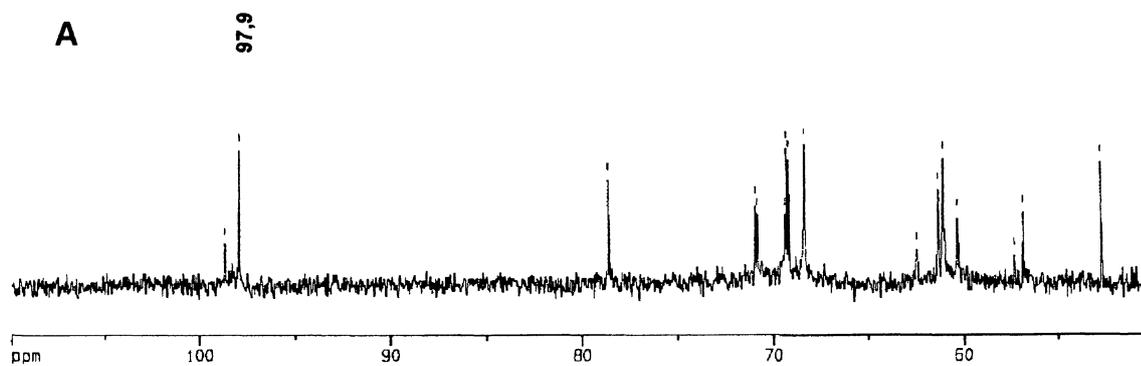


\* RMN- $^{13}\text{C}$ : 98,4 ppm: C-1 digeneasídeo; 97,9 ppm: C-1 floridosídeo.

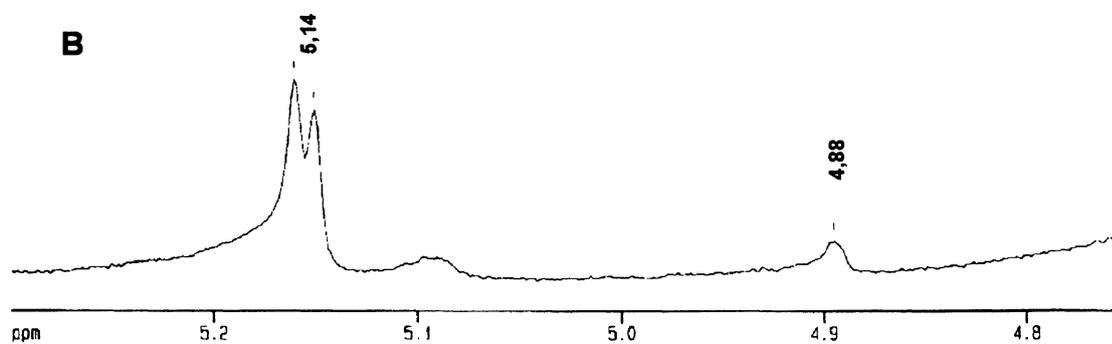


\* RMN- $^1\text{H}$ : 5,14 ppm: H-1 floridosídeo; 4,88 ppm: H-1 digeneasídeo.

FIGURA 31: ESPECTROS DE RMN-<sup>13</sup>C\* (A) E <sup>1</sup>H\* (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *L. clavata*.

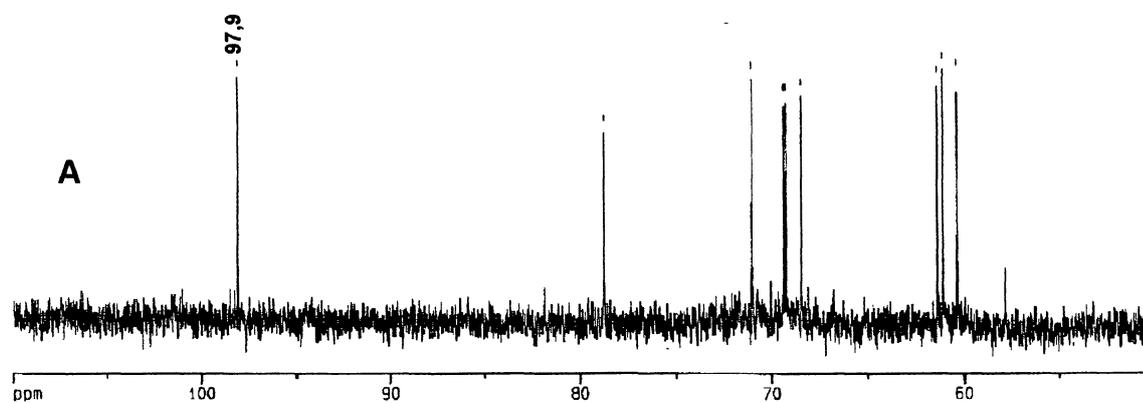


\* RMN-<sup>13</sup>C: 97,9 ppm: C-1 floridosídeo.

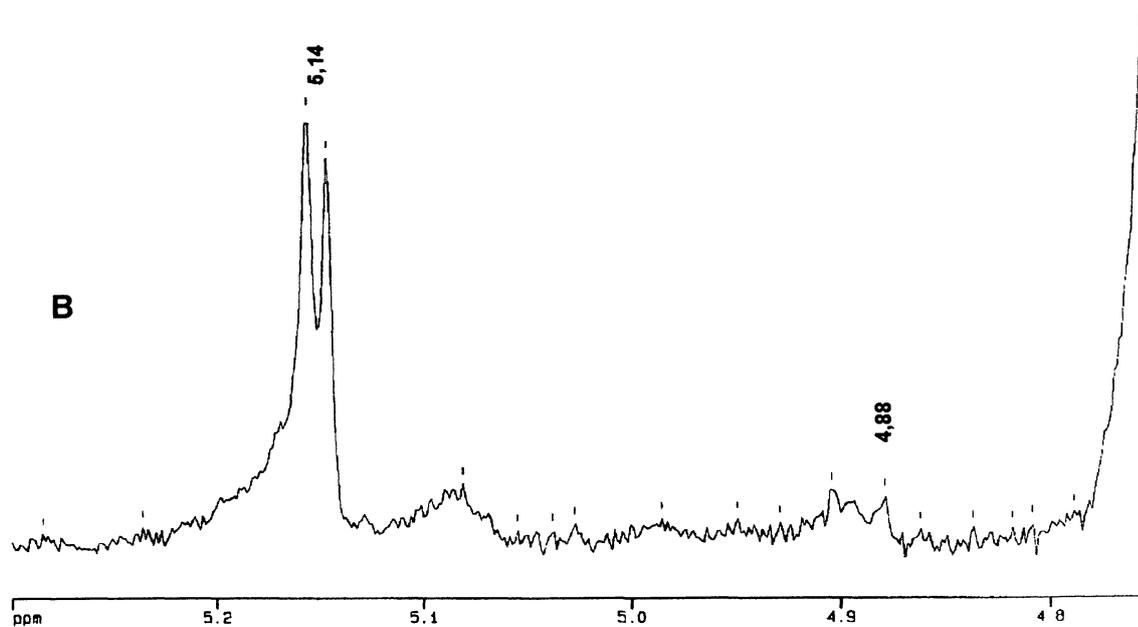


\* RMN-<sup>1</sup>H: 5,14 ppm: H-1 floridosídeo; 4,88 ppm: H-1 digeneasídeo.

FIGURA 32: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}$ \* (A) E  $^1\text{H}$ \* (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *L. filiformis*.

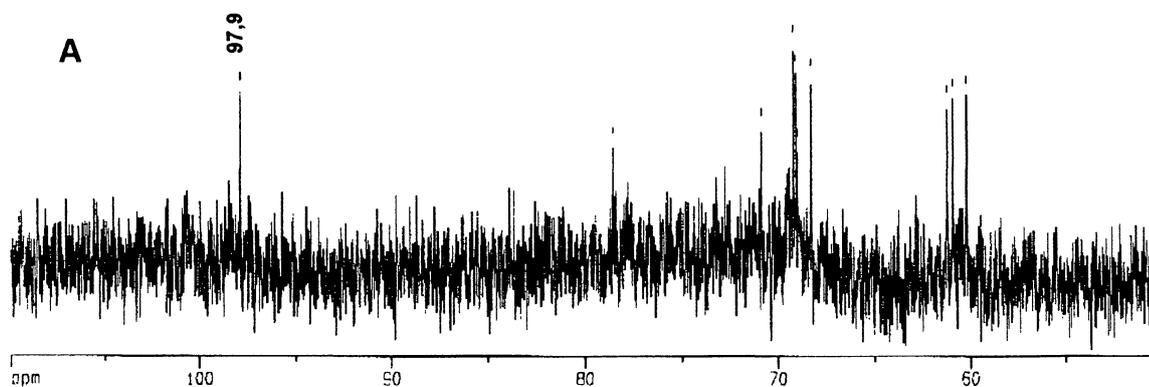


\* RMN- $^{13}\text{C}$ : 97,9 ppm: C-1 floridosídeo.

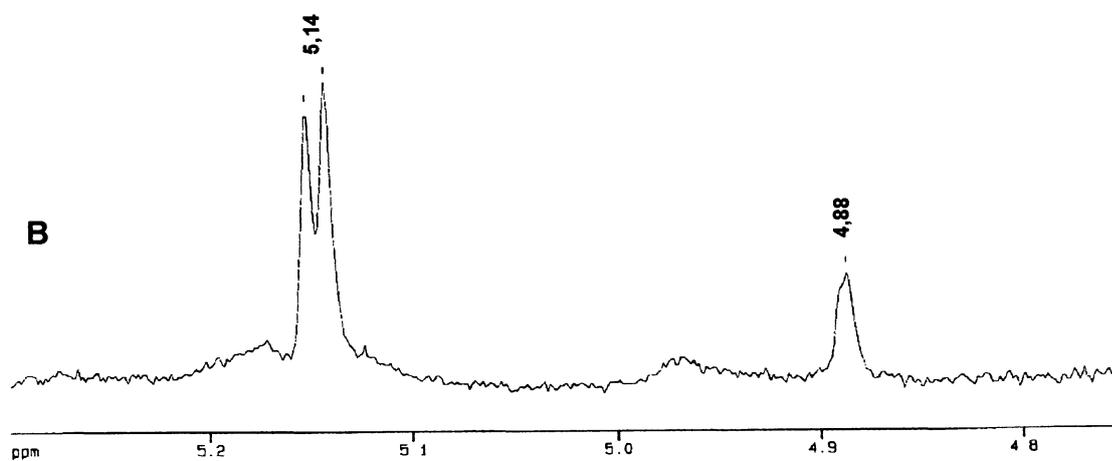


\* RMN- $^1\text{H}$ : 5,14 ppm: H-1 floridosídeo; 4,88 ppm: H-1 digeneasídeo.

FIGURA 33: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}$ \* (A) E  $^1\text{H}$ \* (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *C. trasnslucida*.

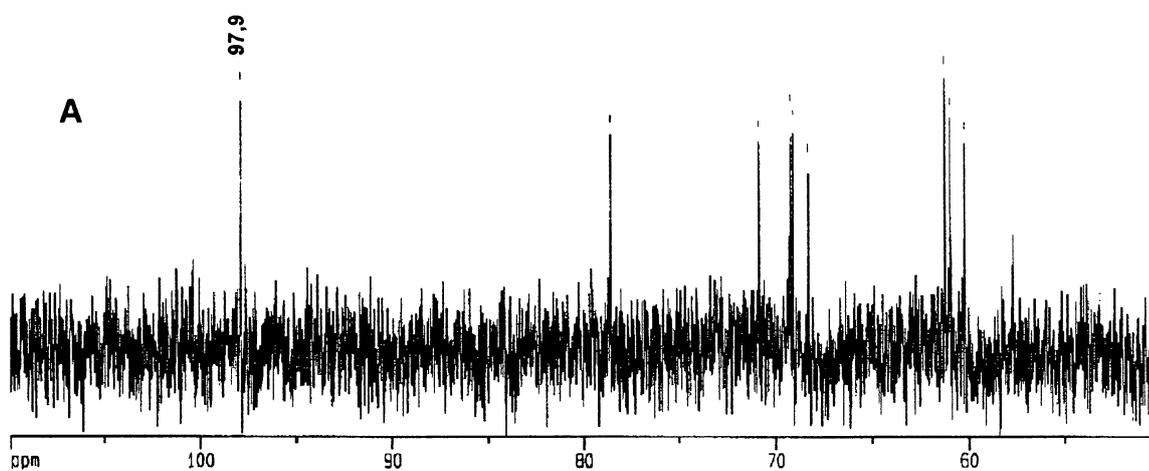


\* RMN- $^{13}\text{C}$ ; 97,9 ppm: C-1 floridosídeo.

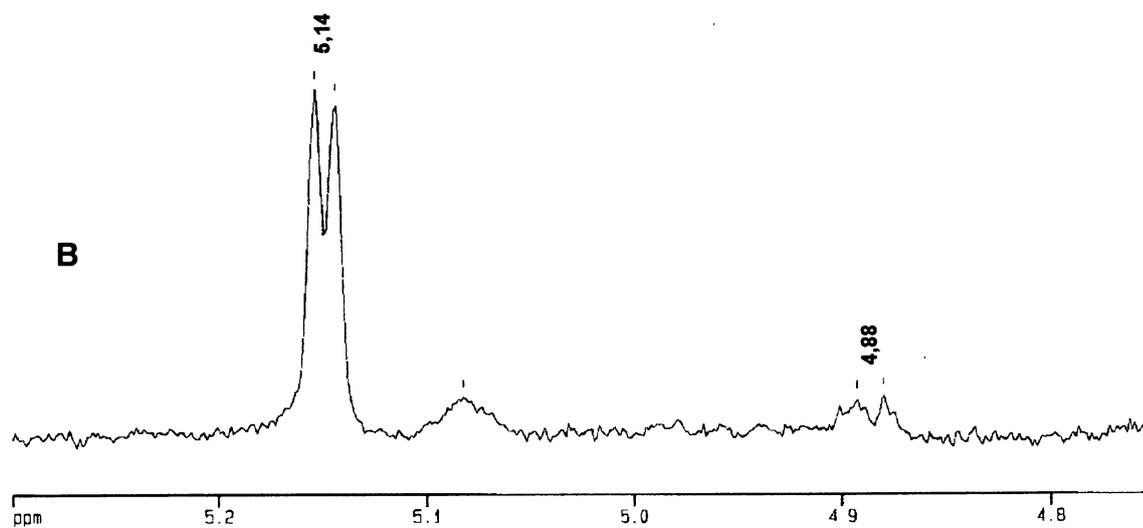


\* RMN- $^1\text{H}$ : 5,14 ppm: H-1 floridosídeo; 4,88 ppm: H-1 digeneasídeo.

FIGURA 34: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}$ \* (A) E  $^1\text{H}$  (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *L. arbuscula*.



\* RMN- $^{13}\text{C}$ : 97,9 ppm: C-1 floridosídeo.



\* RMN- $^1\text{H}$ : 5,14 ppm: H-1 floridosídeo; 4,88 ppm: H-1 digeneasídeo.

### 5.1.2 Análises quantitativas dos CBMM das algas pertencentes ao complexo *Laurencia* (GRUPO A)

A determinação quantitativa dos CBMM foi realizada por CLAE após uma extração etanólica (extração quantitativa, item 3.3 ESQUEMA 2), seguindo a estratégia proposta por KARSTEN et al. (1991). As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em triplicata ( $n=3$ ), sendo os heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo identificados pelo tempo de retenção mediante comparação com padrões autênticos (digeneasídeo: 7,84 min; floridosídeo: 9,53 min) e quantificados através da curva de calibração estabelecida para cada componente. Os resultados foram expressos como a média ( $n=3$ ) da concentração obtida para cada heterosídeo por quilo de alga seca e moída ( $\text{mmol.Kg}^{-1}$ ).

O teor de floridosídeo na alga *L. arbuscula* (13,8 mg alga seca e moída) foi de  $115,49 \text{ mmol.Kg}^{-1}$ . Nesta mesma análise, foi possível detectar digeneasídeo ( $1,83 \text{ mmol.Kg}^{-1}$ ) mesmo em baixas concentrações. Os rendimentos de floridosídeo e digeneasídeo foram de 2,94 e 0,05%, respectivamente (FIGURA 35A). Vale ressaltar que o digeneasídeo não foi detectado nesta espécie quando analisada por RMN- $^{13}\text{C}$  e por RMN- $^1\text{H}$ .

O cromatograma obtido por CLAE para alga *L. clavata* (14,0 mg alga seca e moída) mostrou a presença de ambos heterosídeos, floridosídeo e digeneasídeo, nas concentrações de  $471,04 \text{ mmol.Kg}^{-1}$  (12,02 %) e  $17,46 \text{ mmol.Kg}^{-1}$  (0,47 %), respectivamente (FIGURA 35B).

A análise por CLAE da alga *L. filiformis* (14,1 mg alga seca e moída) também detectou a presença dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo nas concentrações de  $153,38 \text{ mmol.Kg}^{-1}$  (3,51 %) e  $3,60 \text{ mmol.Kg}^{-1}$  (0,10 %), respectivamente (FIGURA 35C).

Para a alga *L. furcata* (14,4 mg alga seca e moída), foi detectado a presença de floridosídeo na concentração de  $523,61 \text{ mmol.Kg}^{-1}$  (13,59 %) e digeneasídeo  $22,47 \text{ mmol.Kg}^{-1}$  (0,61 %) (FIGURA 36A).

A alga *C. flagellifera* (14,5 mg alga seca e moída) apresentou floridosídeo na concentração de  $305,97 \text{ mmol.Kg}^{-1}$  (7,80 %) e digeneasídeo  $21,69 \text{ mmol.Kg}^{-1}$  (0,71 %) (FIGURA 36B).

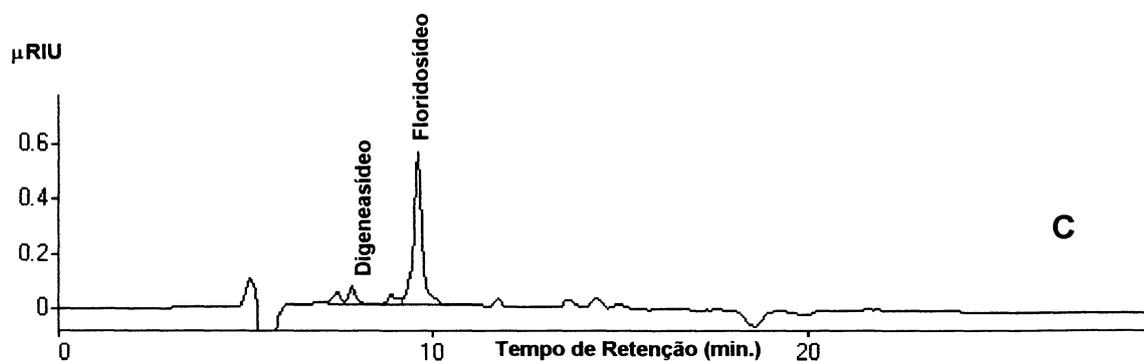
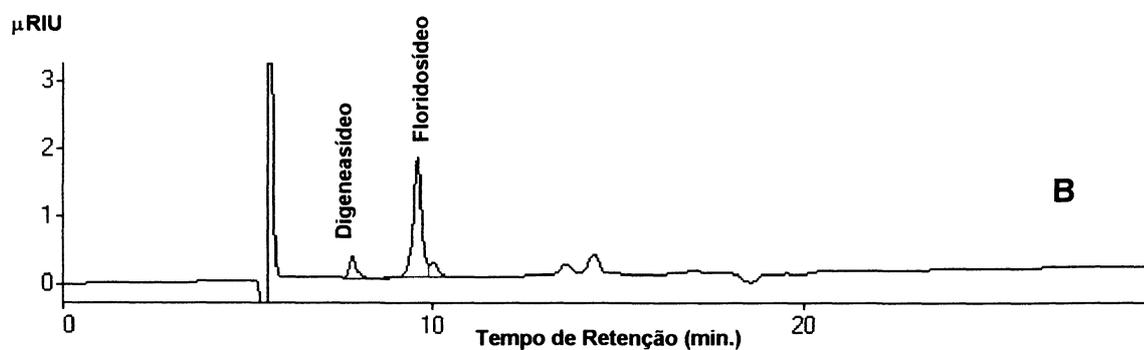
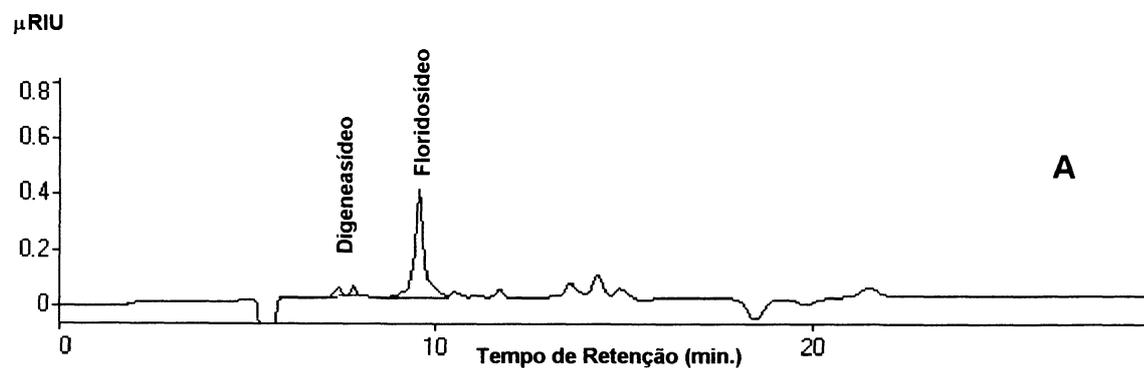
A alga *C. translucida* (13,7 mg alga seca e moída) apresentou floridosídeo na concentração de 125,85 mmol.Kg<sup>-1</sup> (3,21 %) e digeneasídeo 8,92 mmol.Kg<sup>-1</sup> (0,27 %) (FIGURA 36C). Os resultados obtidos por RMN-<sup>13</sup>C, RMN-<sup>1</sup>H e CLAE para este grupo de algas estão descritos na TABELA 5.

TABELA 5: RESULTADOS\* DAS ANÁLISES POR RMN-<sup>13</sup>C, RMN-<sup>1</sup>H E CLAE DAS ALGAS PERTENCENTES AO COMPLEXO *Laurencia* (GRUPO A).

| Alga                   | Heterosídeo  | CLAE                            |                             | RMN             |                |
|------------------------|--------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------|
|                        |              | mmol.Kg <sup>-1</sup><br>(n= 3) | (Rend.) <sup>a</sup><br>(%) | <sup>13</sup> C | <sup>1</sup> H |
| <i>L. arbuscula</i>    | Floridosídeo | 115,49 (0,04)                   | 2,94                        | +               | +              |
|                        | Digeneasídeo | 1,83 (0,001)                    | 0,05                        | -               | ?              |
| <i>L. clavata</i>      | Floridosídeo | 471,04 (0,02)                   | 12,02                       | +               | +              |
|                        | Digeneasídeo | 17,46 (0,003)                   | 0,47                        | ?               | +              |
| <i>L. filiformis</i>   | Floridosídeo | 153,38 (0,01)                   | 3,91                        | +               | +              |
|                        | Digeneasídeo | 3,60 (0,001)                    | 0,10                        | ?               | +              |
| <i>L. furcata</i>      | Floridosídeo | 523,61 (0,01)                   | 13,59                       | +               | +              |
|                        | Digeneasídeo | 22,47 (0,002)                   | 0,61                        | +               | +              |
| <i>C. flagellifera</i> | Floridosídeo | 305,97 (0,01)                   | 7,80                        | +               | +              |
|                        | Digeneasídeo | 21,69 (0,001)                   | 0,71                        | +               | +              |
| <i>C. translucida</i>  | Floridosídeo | 125,85 (0,01)                   | 3,21                        | +               | +              |
|                        | Digeneasídeo | 8,92 (0,001)                    | 0,27                        | ?               | +              |

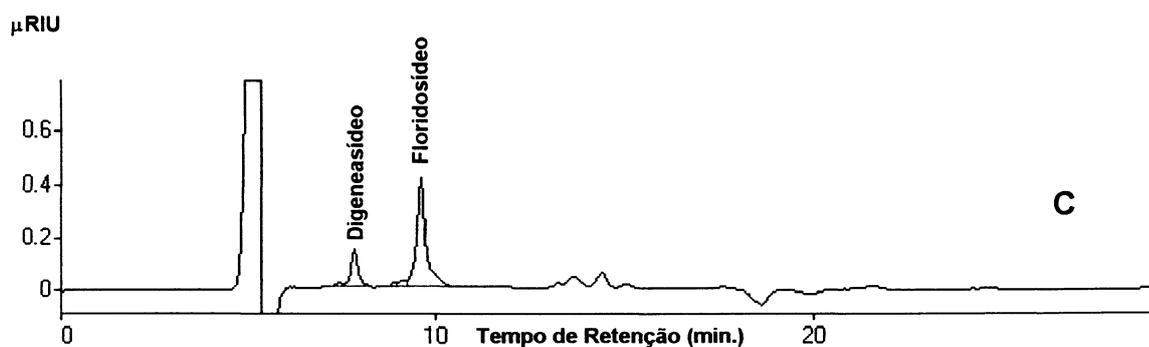
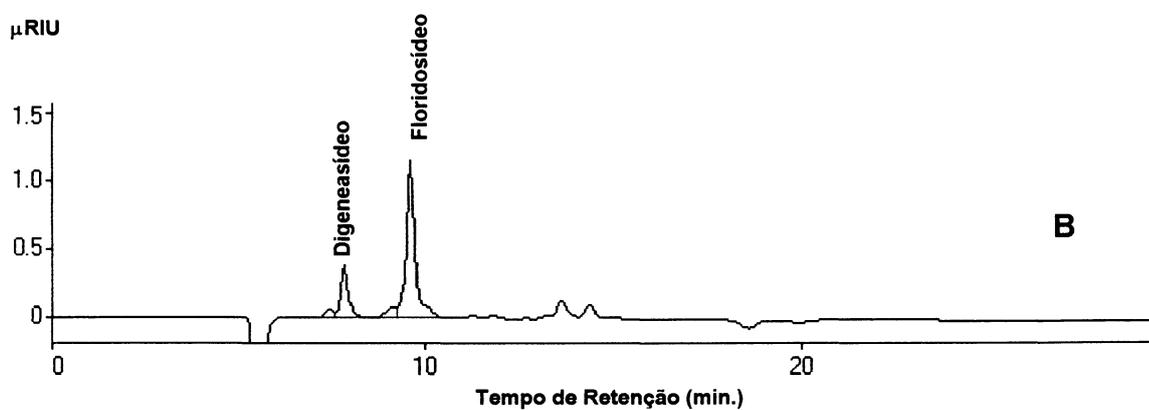
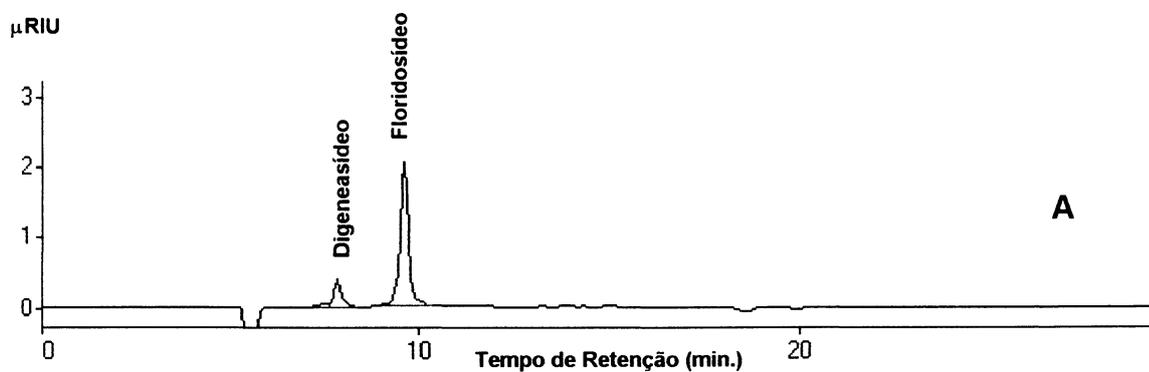
\* Presença do componente: +; ausência: -; não conclusivo: ?; os resultados entre parênteses equivalem ao desvio padrão; <sup>a</sup> rendimento e concentração determinados por CLAE.

FIGURA 35: CROMATOGRAMAS OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DAS ALGAS *L. arbuscula* (A); *L. clavata* (B) e *L. filiformis* (C).



- Coluna: HPX-87H (Aminex® Ion Exclusion)
- Dimensões: 300 x 7,8 mm
- Fase Móvel:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  8 mM em  $\text{H}_2\text{O}$  mQ
- Temperatura da Coluna: 65 °C
- Detector: RID /40 °C
- Fluxo: 0,6 mL.min<sup>-1</sup>.

FIGURA 36: CROMATOGRAMAS OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DAS ALGAS *Laurencia furcata* (A); *Chondrophyucus translucida* (B) e *C. flagellifera* (C) .



- Coluna: HPX-87H (Aminex® Ion Exclusion)
- Dimensões: 300 x 7,8 mm
- Fase Móvel:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  8 mM em  $\text{H}_2\text{O}$  mQ
- Temperatura da Coluna: 65 °C
- Detector: RID /40 °C
- Fluxo: 0,6 mL.min<sup>-1</sup>.

Como pôde ser observado pelos resultados na TABELA 5, em todas as algas estudadas pertencentes ao GRUPO A, o floridosídeo foi o principal heterosídeo encontrado, enquanto que o digeneasídeo foi detectado em concentrações mais baixas. Os resultados obtidos com *L. arbuscula*, *L. filiformis*, *L. furcata* e *C. flagellifera* (antiga *L. flagellifera*) são distintos dos obtidos por BARROW et al. (1995), que utilizaram uma metodologia (RMN-<sup>13</sup>C e CG) não adequada para detectar a presença de digeneasídeo nas espécies de algas estudadas.

Durante as análises de RMN-<sup>13</sup>C, foi possível detectar a presença dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo apenas para as algas *C. flagellifera* e *L. furcata*, obtendo-se para as outras espécies espectros que indicavam a presença apenas de floridosídeo. Quando submetidas à análises de RMN-<sup>1</sup>H, foi possível confirmar, além do floridosídeo, a presença de digeneasídeo nas espécies *L. clavata*, *L. filiformis* e *C. translucida*, evidenciando portanto a diferença na sensibilidade das técnicas empregadas.

Embora a ressonância nuclear magnética de hidrogênio seja mais sensível que a de carbono 13, foi a análise de CLAE que permitiu detectar a presença de digeneasídeo quando em baixas concentrações, como observado para *L. arbuscula*.

BARROW et al. (1995) utilizaram apenas RMN-<sup>13</sup>C para suas análises qualitativas e, portanto, podem não ter encontrado o digeneasídeo por problemas de sensibilidade do método. Quanto as análises quantitativas, estes autores utilizaram cromatografia gasosa (CG) através da análise de derivados acetilados de heterosídeos (KARSTEN et al., 1991). Esta técnica permite uma análise confiável para o floridosídeo, porém, por apresentar um grupamento carboxílico, a molécula de digeneasídeo não é completamente acetilada durante o processo de derivatização, gerando um derivado acetilado que apresenta um grupo carboxílico livre. Este tipo de molécula apresenta tempo de retenção muito elevado em análises por cromatografia gasosa, dificultando sua interpretação. Além disso, devido as características da fase estacionária da coluna (polaridade), estas moléculas podem ficar retidas na coluna (DB 5). Portanto, a cromatografia gasosa não é uma técnica adequada para detectar e quantificar o digeneasídeo.

Durante a realização das análises quantitativas por CLAE das algas pertencentes ao GRUPO A, foi utilizada a coluna HPX-87H (BioRad®). Esta coluna é

capaz de resolver entre os heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, permitindo uma rápida, sensível e confiável técnica para caracterização e quantificação destes glicosídeos.

Como demonstrado pelos resultados obtidos no presente trabalho, a utilização de técnicas adequadas é fundamental para a correta determinação do(s) tipo(s) de CBMM presentes em algas. Vale ressaltar que os resultados aqui apresentados contrariam os dados publicados na literatura (KREMER; VOLG, 1975; KREMER, 1978; KIRST, 1980; BARROW et al., 1995) uma vez que foi comprovada a presença de ambos heterosídeos, floridosídeo e digeneasídeo, sendo biossintetizados juntos, em todas as espécies do grupo A (complexo *Laurencia*). Ressalta-se que os dados de literatura relatam que as algas biossintetizam floridosídeo ou digeneasídeo, sendo a primeira vez que é descrita a presença de ambos.

### 5.1.3 Dosagem de cálcio livre, sódio e potássio (GRUPO A)

KIRST (1980b), estudando a relação entre a composição de íons sódio e potássio citoplasmáticos em diferentes espécies de algas vermelhas, encontrou uma grande variabilidade nas concentrações entre as espécies estudadas, sendo o sódio o principal íon. Através dessas análises, este autor conclui que a variação destes íons no interior do citoplasma não são devidos às condições ambientais (salinidade), e também não conseguiu estabelecer uma relação entre a concentração desses cátions com a concentrações dos carboidratos de baixa massa molecular, uma vez que algas pertencentes ao mesmo gênero [*Grateloupia australis* J. Agardh e *G. filicina* (Lamour) C. Agardh; Rhodophyta: Cryptonemiales] e coletadas na mesma região, apresentavam grandes variações na composição iônica e concentração dos CBMM.

No intuito de verificar se existe alguma relação entre a concentração de íons ( $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e a concentração dos carboidratos de baixa massa molecular (floridosídeo e digeneasídeo) presentes nas algas pertencentes ao complexo *Laurencia* (grupo A), estas algas foram testadas quanto a concentração destes íons.

As dosagens foram realizadas a partir do extrato etanólico (extração quantitativa, item 3.2.2), utilizando técnicas colorimétrica ( $\text{Ca}^{2+}$ , item 3.3.4) e de absorção atômica ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , item 3.3.3).

Os resultados obtidos estão de acordo com os publicados por KIRST (1980), onde para este grupo de algas não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de íons (TABELA 6) e concentração dos carboidratos de baixa massa molecular. Também foi detectado como íon principal o sódio, não havendo inversão da relação sódio/potássio em nenhuma das espécies estudadas.

As dosagens do íon cálcio também não permitiram nenhuma conclusão quanto a sua influência na concentração dos carboidratos de baixa massa molecular, não podendo ser estabelecida nenhuma relação entre estes compostos para este grupo de algas.

TABELA 6: CONCENTRAÇÃO DE ÍONS NAS ALGAS PERTENCENTES AO COMPLEXO *Laurencia* (GRUPO A).

| ALGA                   | Na <sup>+</sup><br>mmol.g <sup>-1</sup> | K <sup>+</sup><br>mmol.g <sup>-1</sup> | RAZÃO<br>Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> | Ca <sup>2+</sup> Livre<br>mmol.g <sup>-1</sup> |
|------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>L. arbuscula</i>    | 676,08                                  | 55,07                                  | 12,27                                    | tr                                             |
| <i>L. clavata</i>      | 4164,28                                 | 468,57                                 | 8,88                                     | tr                                             |
| <i>L. filiformis</i>   | 354,60                                  | 46,80                                  | 7,57                                     | 3,71                                           |
| <i>L. furcata</i>      | 809,72                                  | 170,83                                 | 4,73                                     | tr                                             |
| <i>C. flagellifera</i> | 873,10                                  | 103,44                                 | 8,44                                     | 29,42                                          |
| <i>C. translúcida</i>  | 651,51                                  | 40,87                                  | 15,94                                    | 7,64                                           |

\*tr: traços de cálcio livre (<0,01 mmol).

## 5.2 EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM EM *Acanthophora spicifera* E *Polysiphonia* sp., Rhodophyta, Ceramiales (GRUPO B)

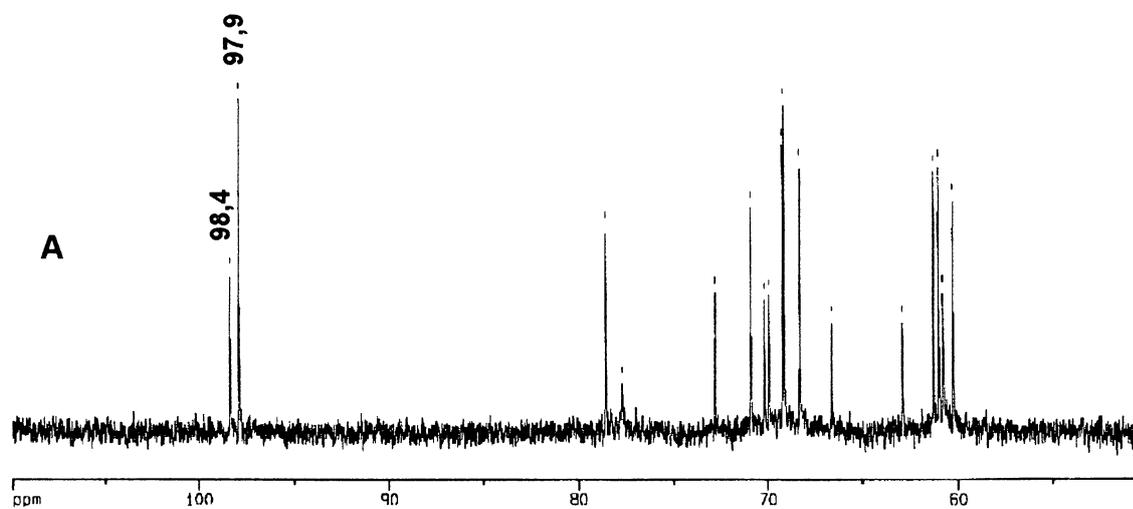
A coleta da alga *Acanthophora spicifera* e *Polysiphonia* sp (GRUPO B) foi realizada no Município de Bombinhas-SC. Da mesma forma que para as espécies do GRUPO A, essas espécies foram submetidas a extração etanólica qualitativa (item 3.2 ESQUEMA 1) para a identificação e caracterização química dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, segundo KASTEN et al. (1991). Foram realizadas análises de RMN-<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H para as espécies em questão, avaliando a presença dos heterosídeos pelos sinais referentes aos carbonos e hidrogênios anoméricos de cada componente.

### 5.2.1 Análises de RMN-<sup>13</sup>C e RMN-<sup>1</sup>H das algas *Acanthophora spicifera* e *Polysiphonia* sp., Ceramiales (GRUPO B)

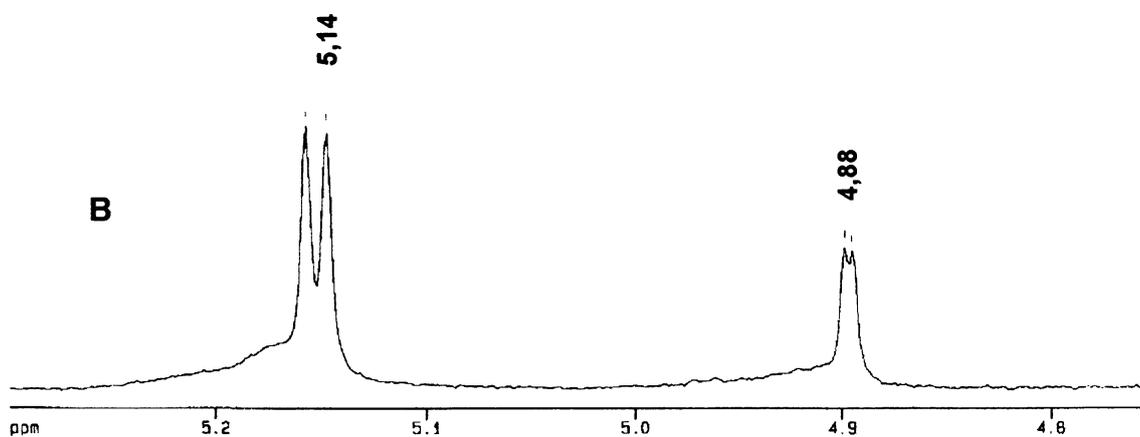
Através das análises de RMN-<sup>13</sup>C foi possível detectar a presença dos heterosídeos floridosídeo (C-1 97,8 ppm) e digeneasídeo (C-1 98,4 ppm) apenas na alga *A. spicifera* (FIGURA 37A), enquanto que para a alga *Polysiphonia* sp, foi detectado apenas digeneasídeo (FIGURA 38A).

Quando submetidas a análises de RMN-<sup>1</sup>H, novamente foi possível determinar a presença dos heterosídeos floridosídeo (H-1 5,14 ppm) e digeneasídeo (H-1 4,88 ppm) na alga *A. spicifera* (FIGURA 37B). Já o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da alga *Polysiphonia* sp. apresentou, além do sinal referente ao digeneasídeo, também o sinal referente ao floridosídeo (FIGURA 38B). Esses resultados sugerem, portanto, a presença destes componentes nas duas espécies, sendo o heterosídeo floridosídeo detectado apenas por RMN-<sup>1</sup>H na alga *Polysiphonia* sp.

FIGURA 37: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}^*$  (A) E DE  $^1\text{H}^*$  (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *Acanthophora spicifera*.

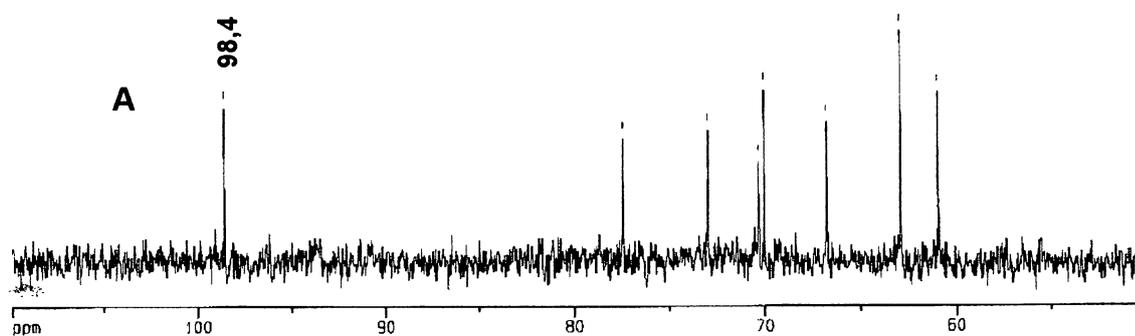


\* Extração qualitativa; C-1 digeneasídeo: 98,4 ppm; C-1 floridosídeo: 97,9 ppm.

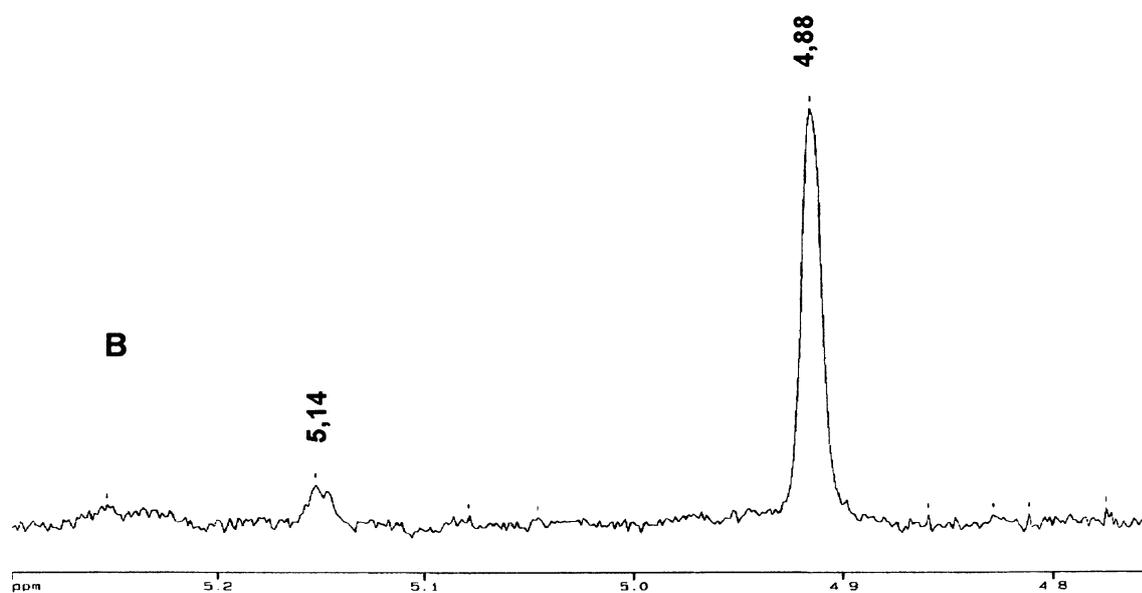


\* Extração qualitativa; H-1 floridosídeo: 5,14 ppm; H-1 digeneasídeo: 4,88 ppm.

FIGURA 38: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}^*$  (A) E DE  $^1\text{H}^*$  (B) DO EXTRATO ETANÓLICO DA ALGA *Polysiphonia* sp.



\* Extração qualitativa; C-1 digeneasídeo: 98,4 ppm.



\* Extração qualitativa; H-1 floridosídeo: 5,14 ppm; H-1 digeneasídeo: 4,88 ppm.

### 5.2.2 Análise quantitativa dos CBMM das algas *Acanthophora spicifera* e *Polysiphonia* sp., Ceramiales (GRUPO B)

Da mesma maneira que para as algas pertencentes ao GRUPO A, para as análises quantitativas por CLAE, foi realizada uma extração etanólica quantitativa (item 3.3 ESQUEMA 2) para as algas *A. spicifera* e *Polysiphonia* sp, seguindo a estratégia proposta por KARSTEN et al. (1991) e a mesma metodologia descrita para o GRUPO A.

Para alga *A. spicifera* (12,0 mg alga seca e moída) foi detectado o heterosídeo floridosídeo na concentração de 461,01 mmol.Kg<sup>-1</sup> e digeneasídeo 42,86 mmol.Kg<sup>-1</sup> (FIGURA 39), apresentando um rendimento de 11,76 e 1,15%, respectivamente.

Já para a alga *Polysiphonia* sp. (12,1 mg alga seca e moída) foram detectados os heterosídeos floridosídeo, na concentração de 49,88 mmol.Kg<sup>-1</sup>, e digeneasídeo 168,67 mmol.Kg<sup>-1</sup> (FIGURA 40), com um rendimento de 1,27 e 4,52 %, respectivamente. Este resultado confirmou a presença do heterosídeo floridosídeo nesta amostra, o qual não havia sido detectado no espectro de RMN-<sup>13</sup>C, sendo evidenciado apenas no espectro de RMN-<sup>1</sup>H.

Novamente foram detectados ambos os heterosídeos, floridosídeo e digeneasídeo, nessas duas espécies, ressaltando-se que na alga *Polysiphonia* sp. detectou-se como heterosídeo principal o digeneasídeo, sendo a única alga pertencente a ordem Ceramiales estudada neste trabalho, que apresentou inversão na relação entre floridosídeo e digeneasídeo.

FIGURA 39: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DA ALGA *A. spicifera*.

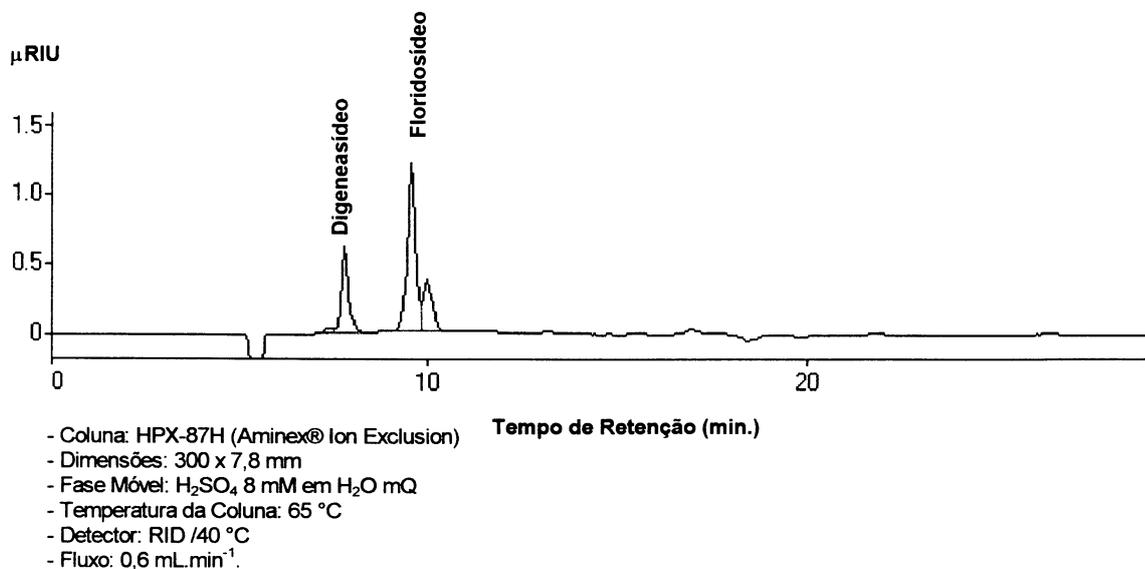
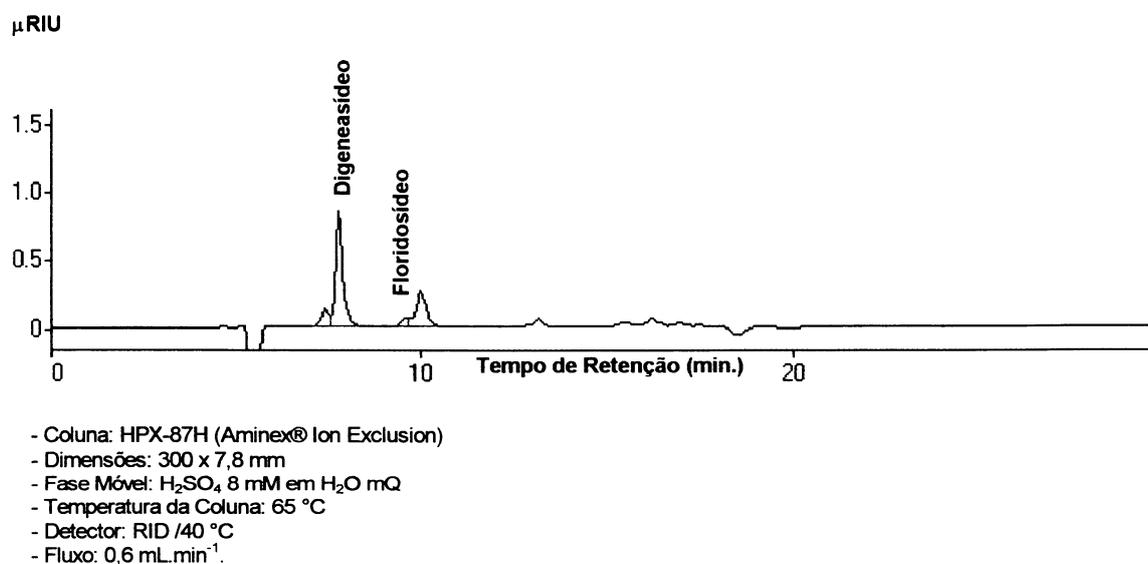


FIGURA 40: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DA ALGA *Polysiphonia* sp.



### 5.2.3 Dosagem de cálcio livre, sódio e potássio (GRUPO B)

Assim como para as espécies pertencentes ao GRUPO A, as algas *A. spicifera* e *Polysiphonia* sp também foram submetidas à dosagem de íons sódio, potássio e cálcio livre.

As dosagens foram realizadas a partir do extrato etanólico (extração quantitativa, item 3.2.2), utilizando técnicas colorimétrica ( $\text{Ca}^{2+}$ , item 3.3.4) e absorção atômica ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , item 3.3.3).

Também para as algas *A. spicifera* e *Polysiphonia* sp., os resultados obtidos estão de acordo com os publicados por KIRST (1980), onde não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de íons (TABELA 7) e concentração dos carboidratos de baixa massa molecular. Novamente, o íon sódio foi detectado como íon principal, não havendo inversão da relação sódio/potássio em nenhuma das duas espécies.

As dosagens do íon cálcio também não permitiram nenhuma conclusão quanto a sua influência na concentração dos carboidratos de baixa massa molecular, uma vez que nestas duas espécies foi detectado apenas traços deste íon.

Os resultados estão descritos na TABELA 7.

TABELA 7: TABELA DE CONCENTRAÇÃO DE ÍONS NAS ALGAS *A. spicifera* e *Polysiphonia* sp.

| ALGA                   | $\text{Na}^+$<br>$\text{mmol.g}^{-1}$ | $\text{K}^+$<br>$\text{mmol.g}^{-1}$ | RAZÃO<br>$\text{Na}^+/\text{K}^+$ | $\text{Ca}^{2+}$ Livre<br>$\text{mmol.g}^{-1}$ |
|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>A. spicifera</i>    | 2216,66                               | 1369,16                              | 1,61                              | tr                                             |
| <i>Polysiphonia</i> sp | 1216,66                               | 213,33                               | 5,70                              | tr                                             |

\* tr: traços de cálcio livre.

### 5.3 EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM EM *Gracilaria cervicornis* Rhodophyta: Gracilariales E *Tricleocarpa cylindrica* Rhodophyta: Nemaliales (GRUPO C)

Dentre as 10 espécies de algas analisadas neste trabalho, 8 delas (GRUPOS A e B) pertencem a ordem Ceramiales. Porém, as algas que compõe o GRUPO C, *Gracilaria cervicornis* e *Tricleocarpa cylindrica* são pertencentes as ordens Gracilariales e Nemaliales, respectivamente. Estas algas foram coletadas no Município de Bombinhas-SC.

Da mesma forma que para as espécies estudadas anteriormente, (GRUPOS A e B), as algas *G. cervicornis* e *T. cylindrica* foram submetidas a extração etanólica qualitativa (item 3.2 ESQUEMA 1) para as análises de identificação e caracterização química dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, segundo KARSTEN et al. (1991). Foram realizadas análises de RMN-<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H para estas duas espécies, avaliando-se a presença dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, os quais foram evidenciados pelos sinais referentes ao carbono e próton anomérico de cada componente.

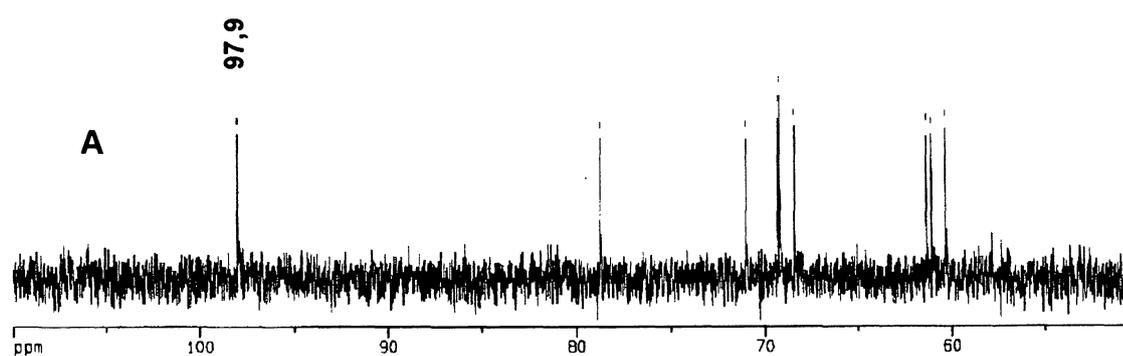
#### 5.3.1 Análises de RMN-<sup>13</sup>C e RMN-<sup>1</sup>H das algas *Gracilaria cervicornis* e *Tricleocarpa cylindrica* (GRUPO C)

Através das análises de RMN-<sup>13</sup>C foi possível detectar apenas a presença do heterosídeo floridosídeo (C-1 97,8 ppm) em ambas as espécies, enquanto que, para o digeneasídeo (C-1 98,4 ppm), o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da alga *T. cylindrica* (FIGURA 41A) mostrou ausência de sinais referentes a este composto e o da alga *G. cervicornis* (FIGURA 42A) não foi conclusivo, apresentando apenas alguns sinais de baixa intensidade.

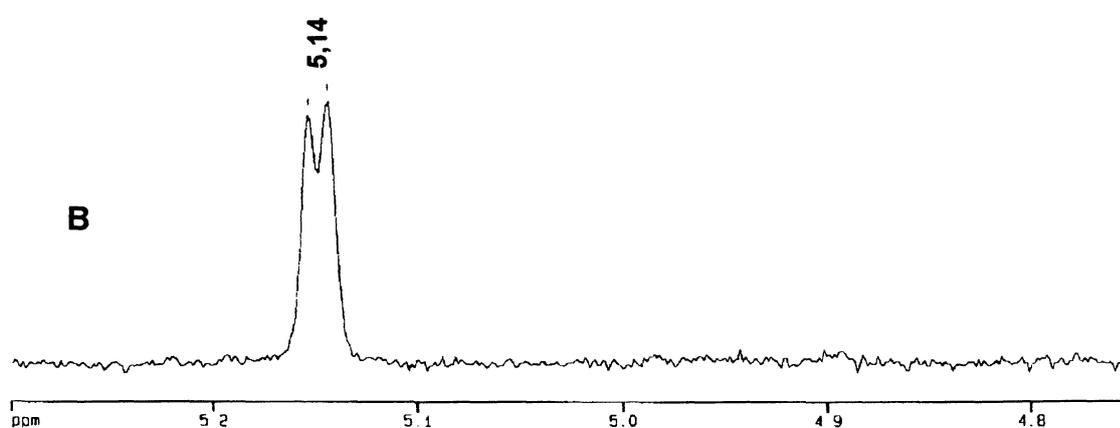
Quando submetidas a análises de RMN-<sup>1</sup>H, novamente foi possível determinar a presença do heterosídeo floridosídeo (H-1 5,14 ppm) nas duas espécies. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H do extrato etanólico da alga *T. cylindrica* mostrou ausência de digeneasídeo (FIGURA 41B), enquanto que para *G. cervicornis* apenas

um pequeno sinal (H-1 4,88 ppm) sugerindo a presença do heterosídeo digeneasídeo (FIGURA 42B).

FIGURA 41: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}^*$  (A) E DE  $^1\text{H}^*$  (B) DA EXTRAÇÃO ETANÓLICA QUALITATIVA DA ALGA *T. cylindrica*.

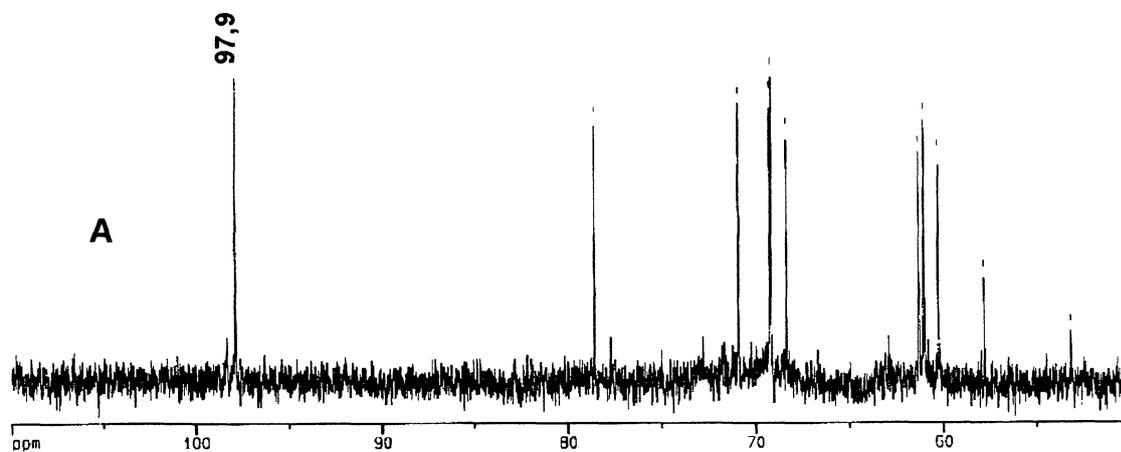


\* Extração qualitativa; C-1 floridosídeo: 97,9 ppm.

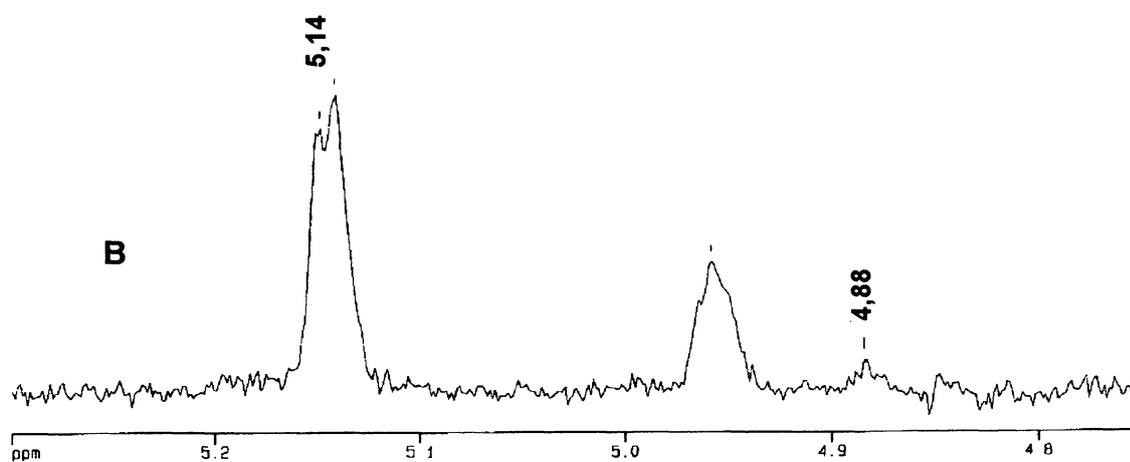


\* Extração qualitativa; H-1 floridosídeo: 5,14 ppm.

FIGURA 42: ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}^*$  (A) E  $^1\text{H}^*$  (B) DA EXTRAÇÃO ETANÓLICA QUALITATIVA DA ALGA *G. cervicornis*.



\* Extração qualitativa; C-1 floridosídeo: 97,9 ppm.



\* Extração qualitativa; H-1 floridosídeo: 5,14 ppm; H-1 digeneasídeo: 4,88 ppm.

### 5.3.2 Análise quantitativa dos CBMM das algas *Gracilaria cervicornis* e *Tricleocarpa cylindrica* (GRUPO C)

Da mesma maneira que para as algas analisadas anteriormente, foi realizada uma extração etanólica quantitativa (item 3.3 ESQUEMA 2) para as algas *G. cervicornis* e *T. cylindrica*, seguindo a estratégia proposta por KARSTEN et al. (1991). Após a extração seguiu-se as análises quantitativas via CLAE utilizando a mesma metodologia descrita para o GRUPO A.

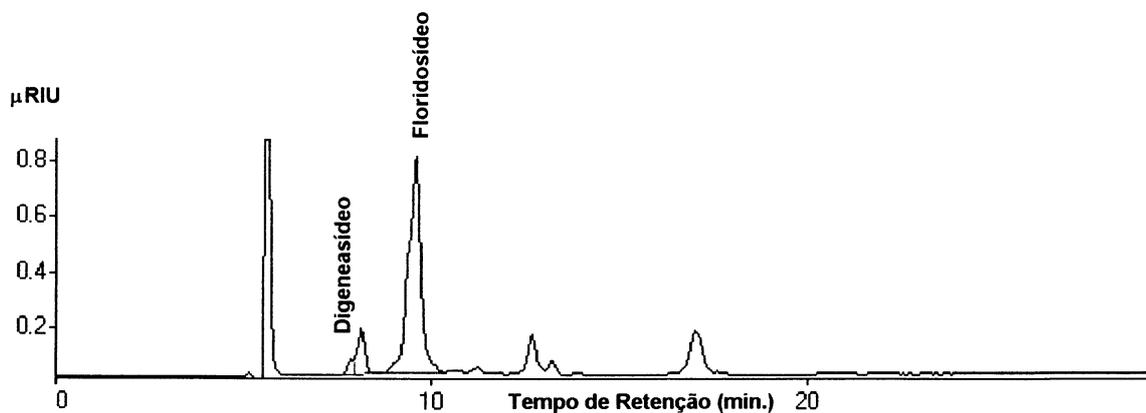
Para alga *G. cervicornis* (17,0 mg alga seca e moída) foi detectado o heterosídeo floridosídeo na concentração de 246,73 mmol.Kg<sup>-1</sup> e digeneasídeo, 2,10 mmol.Kg<sup>-1</sup> (FIGURA 43), apresentando um rendimento de 6,28 e 0,56%, respectivamente.

Já para a alga *T. cylindrica* (15,0 mg alga seca e moída) foram detectados os heterosídeos floridosídeo, na concentração de 108,56 mmol.Kg<sup>-1</sup>, e digeneasídeo, 0,69 mmol.Kg<sup>-1</sup> (FIGURA 44), com um rendimento de 2,77 e 0,02 %, respectivamente.

Estes resultados confirmaram a presença de pequenas concentrações de digeneasídeo em ambas as algas, o qual não havia sido claramente detectado nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C e RMN-<sup>1</sup>H.

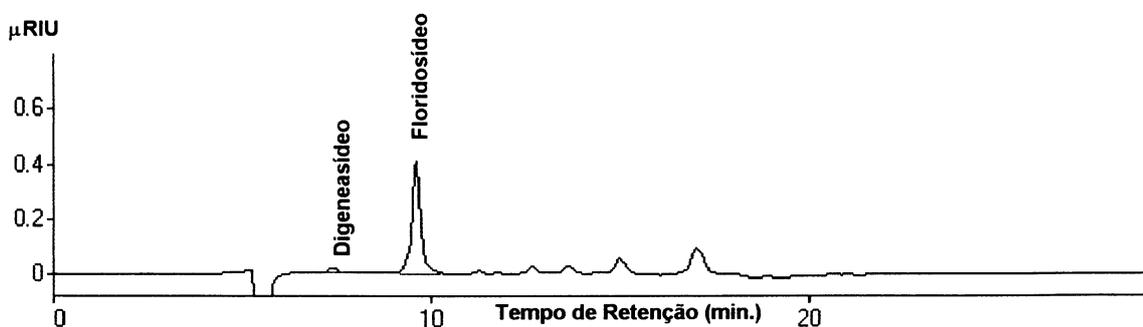
KREMER; VOGL, 1795, estudando os carboidratos de baixa massa molecular de várias algas da ordem Gracilariales, incluindo *Gracilaria foliifera* (Forsk.) Boerg; *G. verrugosa* (Huds.) Papenf. e duas algas da ordem Nemaliales: *Nemalion helminthoides* (Vell.) Batt; *Trailiella intricata* Batt., detectou, através da incorporação de <sup>14</sup>C, apenas o heterosídeo floridosídeo para as espécies pertencentes a estas ordens. Portanto, os resultados obtidos para as algas pertencentes as ordem Gracilariales e Nemaliales, provam que a biossíntese do heterosídeo digeneasídeo não é exclusividade das algas pertencentes a ordem Ceramiales, contradizendo os dados da literatura.

FIGURA 43: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CALE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DA ALGA *G. cervicornis*.



- Coluna: HPX-87H (Aminex® Ion Exclusion)
- Dimensões: 300 x 7,8 mm
- Fase Móvel:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  8 mM em  $\text{H}_2\text{O}$  mQ
- Temperatura da Coluna: 65 °C
- Detector: RID /40 °C
- Fluxo: 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

FIGURA 44: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DA EXTRAÇÃO QUANTITATIVA DA ALGA *T. cylindrica*.



- Coluna: HPX-87H (Aminex® Ion Exclusion)
- Dimensões: 300 x 7,8 mm
- Fase Móvel:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  8 mM em  $\text{H}_2\text{O}$  mQ
- Temperatura da Coluna: 65 °C
- Detector: RID /40 °C
- Fluxo: 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 5.3.3 Dosagem de cálcio livre, sódio e potássio (GRUPO C)

Assim como para as espécies pertencentes ao GRUPO A, as algas *G. cervicornis* e *T. cylindrica* também foram submetidas à dosagem de íons sódio, potássio e cálcio livre.

As dosagens foram realizadas a partir do extrato etanólico (extração quantitativa, item 3.2.2), utilizando técnicas colorimétrica ( $\text{Ca}^{2+}$ , item 3.3.4) e absorção atômica ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , item 3.3.3).

Novamente, os resultados obtidos para as algas *G. cervicornis* e *T. cylindrica* estão de acordo com os publicados por KIRST (1980), onde não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de íons (TABELA 8) e concentração dos carboidratos de baixa massa molecular. Porém, para a alga *G. cervicornis*, ocorreu uma inversão na concentração do íon principal, quando comparado com as demais algas estudadas neste trabalho, onde o íon potássio foi detectado como principal. Resultados semelhantes foram obtidos por KIRST (1980) para algas *Gracilaria verrucosus* (Hudson) Papenfuss e *G. edulis* (Gmel.) Silva, ambas pertencentes a ordem Gracilariales.

As dosagens do íon cálcio também não permitiram nenhuma conclusão quanto a sua influência na concentração dos carboidratos de baixa massa molecular; porém, dentre as 10 espécies de algas estudadas neste trabalho, a que apresentou a maior concentração de cálcio livre foi *G. cervicornis*.

Os resultado estão descritos na TABELA 8.

TABELA 8: CONCENTRAÇÃO DE Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> E Ca<sup>2+</sup> NAS ALGAS *T. cylindrica* E *G. cervicornis*.

| <b>ALGA</b>           | <b>Na<sup>+</sup><br/>mmol.g<sup>-1</sup></b> | <b>K<sup>+</sup><br/>mmol.g<sup>-1</sup></b> | <b>RAZÃO<br/>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></b> | <b>Ca<sup>2+</sup> Livre<br/>mmol.g<sup>-1</sup></b> |
|-----------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>G. cervicornis</i> | 1723,52                                       | 3047,05                                      | 0,56                                          | 29,79                                                |
| <i>T. cylindrica</i>  | 1400,01                                       | 1340,03                                      | 1,04                                          | 12,81                                                |

## **CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

1) As técnicas cromatográficas: cromatografia de adsorção (carvão: Celite) e filtração em Gel (BioGel P-2) mostraram-se eficientes para a obtenção de padrões (com alto grau de pureza) dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo;

2) Dentre as técnicas analíticas utilizadas (CLAE; RMN-1H e 13C; CG-EM), a cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se como a mais adequada para a identificação e quantificação conjunta dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo em algas marinhas;

3) Em todas as espécies de algas estudadas foi detectada a presença de ambos os heterosídeos (floridosídeo e digeneasídeo) por uma ou mais técnicas analíticas;

4) Foram verificadas diferenças nas concentrações dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, com grande variação da relação floridosídeo/digeneasídeo, não havendo relação entre a concentração de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) e a dos CBMM entre as espécies estudadas;

5) O heterosídeo digeneasídeo não é um produto fotossintético exclusivo de espécies de algas pertencentes à ordem Ceramiales e, portanto sua presença ou ausência não pode ser considerada como caráter quimiotaxonômico desta ordem.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. São Paulo: E. Blücher, 1968.

AUGIER, J. **C. r. Hebd. Seances Acad. Sci.**, Paris, v. 239, p. 87, 1954.

BARROW, K. D.; KARSTEN, U.; KING, R. J.; WEST, J. A. Floridoside in the genus *Laurencia* (Rhodomelaceae: Ceramiales) - a chemosystematic study. **Phycologia**, Lawrence, v. 34, n. 4, p. 279-283, 1995.

BAUER, J. B. Affinity and Stoichiometry of Calcium Binding by Arsenazo III. **Anal. Biochem.**, New York, v. 110, p. 61-72, 1981.

BOUVENG, H.; LINDBERG, B.; WICKBERG, B. Low-molecular Carbohydrates in Algae. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 9, p. 807-809, 1955.

CAUDURO, J. P. **Estudo estrutural de Galactanas Sulfatadas e Piruvatadas isoladas de *Acanthophora spicifera*. Tese de Mestrado**. Curitiba, 2000. 103 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

COLIN, H.; AUGIER, J. La constitution du principe sucré de *Rhodymenia palmata*. **C. r. Hebd. Seances Acad. Sci.**, Paris, v. 209, p. 1450, 1939.

COLIN, H.; GUÉGEM, E. **C. r. Hebd. Seances Acad. Sci.**, Paris, v. 191, p. 163, 1930.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 2 ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1987.

COURT, G. J. Photosynthesis and translocation studies of *Laurencia spectabilis* and its symbiont *Janczewskia gardneri* (Rhodophyceae). **J. Phycol.**, Lawrence, v. 16, p. 270-279, 1980.

CROWE, J.; CROWE, L.; CARPENTER, J.; WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochem. J.**, London, v. 242, p. 1-10, 1987.

DUARTE, M. E. R.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; NOSEDA, M. D. Low-molecular-weight carbohydrates from red seaweeds. In: Encontro de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear, 6., 1997. Angra dos Reis. **Anais ...** p. 317-323.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Whashington, v. 28, p. 350-356, 1956.

GONÇALVES, A. G. **Oligossacarídeos Piruvatados e Sulfatados obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas (Rhodophyta)**. Curitiba, 2001. 100 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further Studies on the Assignment of Signals in  $^{13}\text{C}$  Magnetic Resonance Spectra of Aldoses and Derived Methyl Glycosides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 53, p. 1212-1223, 1975.

JACKSON, S. G.; McCANDLESS E. L. Simple, rapid, turbidimetric determination of inorganic sulfate and/or protein. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 90, p. 802-808, 1978.

KARSTEN, U. Seasonal variation in heteroside concentrations of field-collected *Porphyra* species (Rhodophyta) from different biogeographic regions. **New Phytol.**, Cambridge, v. 143, p. 561-571, 1999.

KARSTEN, U.; BARROW, K. D.; MOSTAERT, A. S.; KING, R. J.; WEST, J. A.  $^{13}\text{C}$ - and  $^1\text{H}$ -NMR studies on digeneaside in the red alga *Colaglossa leprerii*. A re-evaluation of its osmotic significance. **Plant. Physiol. Biochem.**, Paris, v. 32, n. 5, p. 669-676, 1994.

KARSTEN, U.; BARROW, K. D.; KING, R. J. Floridoside, L-isofloridoside and D-isofloridoside in the red alga *Porphyra columbina* – Seasonal and osmotic effects. **Plant. Physiol.**, Rockville, v. 103, p. 485-491, 1993.

KARSTEN, U.; THOMAS, D. N.; WEYKAM, G.; DANIEL, C.; KIRST, G. O. A simple and rapid method for extraction and separation of low molecular weight carbohydrates from macroalgae using high-performance liquid chromatography. **Plant. Physiol. Biochem.**, Paris, v. 29, p. 373-378, 1991.

KARSTEN, U.; WEST, J. A.; ZUCCARELLO, G. Polyol content of *Bostrychia* and *Stictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from field and culture. **Bot. Mar.**, New York, v. 35, p. 11-19, 1992.

KARSTEN, U.; WEST, J. A.; ZUCCARELLO, G. C.; NIXDORF, O.; BARROW, K. D.; KING, R. J. Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (RHODOPHYTA). **J. Phycol.**, Lawrence, v. 35, p. 967-976, 1999.

KIRST, G. O. Low molecular weight carbohydrates and ions in Rhodophyceae: quantitative measurement of floridoside and digeneaside. **Phytochemistry**, Oxford, v. 19, p. 1107-1110, 1980a.

KIRST, G. O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.**, Palo Alto, v. 41, p. 21-53, 1980b.

KREMER, B. P. Distribution of Alditois in the Genus *Bostrychia*. **Biochem. Syst. Ecol.**, Kidlington, v. 4, p. 139-141, 1976.

KREMER, B. P.; VOLG, R. Zur chemotaxonomischen bedeutung des [<sup>14</sup>C]-markierungsmusters bei rhodophyceen. **Phytochemistry**, Oxford, v. 14, p. 1309-1314, 1975.

LEE, R. E. **Phycology**. 2. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 645 p.

MAJCZAK, G. A. H. **Polissacarídeos Sulfatados de *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Phaeophyta) – Estrutura Química e Atividade Biológica**. Curitiba, 1989. 108 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MENG, J.; ROSELL, K. G.; SRIVASTAVA, L. M. Chemical characterization of floridoside from *Porphyra perforata*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 161, p. 171-180, 1987.

NEUE, V. D. **HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice**. New York: Wiley – VCH, 1997. p. 7-41.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 248-259.

SOUTH, G. R.; WHITTICK, A. **Introduction to Phycology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. 341 p.

STEVAN, F. R. **Efeitos Biológicos de Heteropolissacarídeos Sulfatados e/ou Carboxilados, isolados de Macroalgas marinhas, sobre células HeLa**. Curitiba, 2001. 137 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

TULIO, S. **Polissacarídeos sulfatados isolados de *Bostrychia montagnei* (Rhodophyta, Ceramiales)**. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **ALGAE An introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 627 p.

VIANA, A. G. **Estudo de uma porfirana com estrutura não usual obtida da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne (Bangiales, Rhodophyta)**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ZIBETTI, R. G. M. **Determinação da estrutura química de galactanas híbridas-D/L isoladas da alga vermelha *Criptonemia crenulata* (Criptonemiales, Rhodophyta)**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WHISTLER, R. L.; DURSO, D. F. Chromatographic Separation of Sugars on Charcoal, **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 72, p. 677-679, 1950.

WHYTE, J. N. C. Proton magnetic resonance and mass spectrometric studies on derivatives of sodium 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycerate and related compounds. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 47, p. 4083-4086, 1969.