

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISLAINE CRISTINA DOS SANTOS FIDENCIO

OXIDAÇÃO SELETIVA DE *KAPPA*-CARRAGENANA:
EFEITO ANTICOAGULANTE, AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES REOLÓGICAS E
PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS

CURITIBA

2019

GISLAINE CRISTINA DOS SANTOS FIDENCIO

OXIDAÇÃO SELETIVA DE *KAPPA*-CARRAGENANA:
EFEITO ANTICOAGULANTE, AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES REOLÓGICAS E
PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS

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

Orientador: Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti

Coorientador: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Fidencio, Gislaine Cristina dos Santos

Oxidação seletiva de *Kappa*-carregenana: efeito anticoagulante, avaliação de propriedades reológicas e produção de oligossacarídeos alditóis. / Gislaine Cristina dos Santos Fidencio. – Curitiba, 2019.

181 p.: il.

Orientador: Diogo R. Bazan Ducatti

Coorientador: Alan Guilherme Gonçalves

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

1. Oligossacarídeos 2. Oxidação 3. Anticoagulantes 4. Reologia (Biologia) 5. Rodófitas I. Título II. Ducatti, Diogo Ricardo Bazan III. Gonçalves, Alan Guilherme IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica.

CDD (22. ed.) 5572.565



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2


TERMO DE APROVAÇÃO

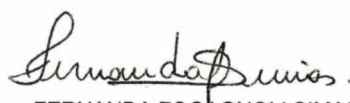
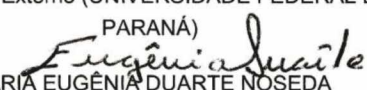
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **GISLAINE CRISTINA DOS SANTOS FIDENCIO**, intitulada: **OXIDAÇÃO SELETIVA DE KAPPA-CARRAGENANA: EFEITO ANTICOAGULANTE, AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS**, sob orientação do Prof. Dr. DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

Curitiba, 27 de Setembro de 2019.


DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI
Presidente da Banca Examinadora


ADRIANO GONÇALVES VIANA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA)


FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ)

MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ)

Com muito amor:

Ao meu esposo Jefferson, minha filha Yasmin e aos meus pais, Ivo e Neuza.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela capacidade, pela força, determinação e sabedoria!

Aos meus pais e meu marido, pelo apoio, motivação, incentivo e pela compreensão em muitos momentos. À minha mãe, que por tantas vezes viajou (700 km) ao longo desse ano para me ajudar com a Yasmin. Ao meu pai, pelo exemplo de homem e de força. Ao Jé, que esteve ao meu lado durante todo o doutorado, que desde o início do nosso relacionamento sempre me apoiou e me acompanhou, que faz meus dias serem mais felizes, leves e, claro, pelo pai maravilhoso que é... Te amo!

À minha pequenininha que chegou para mudar nossas vidas, que nos enche com tanto amor e que me ensina todos os dias o significado da palavra mãe.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti, por ter me aceito como aluna, por ter sido um orientador muito presente, pela prontidão, disposição e conversas em todos os momentos.

Aos meus coorientadores, Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira e Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves, pelas sugestões e correções. Em especial à profa Joana, por ter compartilhado comigo um pouco de seu conhecimento me ajudando com os resultados reológicos e com os textos. Foi muito prazeroso trabalhar com a reologia. Muito obrigada!

Aos meus supervisores no exterior, Professores Dr. Paul Murphy e Zoe Popper e à todos os técnicos da National University of Galway.

Aos professores Dr. Miguel Daniel Nosedá e Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte pela colaboração ao longo dos anos.

Às professoras Dra. Lucimara Mach C. Cordeiro e Dra. Joana Léa Meira Silveira pelas correções e sugestões do projeto, relatórios e qualificação.

À banca examinadora, composta pelo Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana e Profas Dra. Fernanda Fogagnoli Simas e Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte pela avaliação e correção deste trabalho.

À Profa Dra. Maria de Lourdes Corradi, pelo ensino de Bioquímica durante minha graduação o qual me despertou o desejo e amor pela Bioquímica. Obrigada por ter me indicado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFPR.

Ao Centro de RMN do Departamento de Bioquímica da UFPR.

Às técnicas, Eliz e Flávia, pelas análises no HPSEC-MALLS.

Ao centro de microscopia eletrônica (CME) da UFPR.

À Profa Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco, do departamento de Biologia Celular da UFPR, pela disposição, ajuda e análise das micrografias eletrônicas.

Ao CETFAR (Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos) da Universidade Federal de Santa Maria, pela doação do plasma ovino utilizado nos testes anticoagulantes.

À Profa. Dra. Andrea Pinto de Oliveira do departamento de Química, e a técnica Natália do LPH (Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas) pelas análises quantitativas de íons.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, em especial Fran Colodi e Shayla Barbieri pela ajuda com os experimentos.

Aos meus amigos que fiz durante o mestrado Jana, Glauco, Willian e Helyn, obrigada pelo companheirismo e risadas. Em especial a Jana por essa amizade sincera que foi sendo construída desde o primeiro dia no Lab 318, quem me ensinou, principalmente sobre mim mesma, e me influenciou ao ponto de me transformar no que sou hoje.

Aos meus amigos de bancada Jana, Jaque, Edson, Manoella e Barbára, e à todos os amigos do Lab 269, por todos os momentos de ajuda e descontração!

Aos amigos Karen, Ines, Adele, Francesco, Martin, Raphael e Carmel que fiz durante o período em que passei em Galway. Jamais irei esquecê-los!

À Samara, que caminha junto comigo desde a graduação. Obrigada pela força e amizade queridinha!

À minha amiga de mais longa data, Nayara, que mesmo tão distante, nossa irmandade permanece.

Aos meus sogros Neiva e Larzio Fidencio, por me apoiarem, pelo carinho, por serem tão prestativos, amáveis e maravilhosos. Obrigada sogrinha por ser como uma mãe! Muito obrigada de todo coração!

Aos meus cunhados Thaís, Aline e Bruno, por sempre trazerem alegrias e diversão em nossas vidas!

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

Ao CNPq e à Capes (bolsa sanduíche) pela oportunidade de bolsa. Às demais agências de fomento e projetos que financiaram este trabalho: PRONEX - Carboidratos, Fundação Araucária e Projeto Universal.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

Carragenanas são polissacarídeos hidrocolóides sulfatados extraídos de algas vermelhas (Rhodophyta). Devido suas propriedades gelificantes e viscosantes, são utilizadas em setores industriais, como o alimentício. Além disso, exibem atividades biológicas como antitumoral, antiviral, antioxidante e anticoagulante. No presente trabalho, *kappa*-carragenana obtida de *Kappaphycus alvarezii* foi oxidada seletivamente com os reagentes TEMPO e TCCA, produzindo unidades de β -D-galactopiranosidurônico na cadeia polissacarídica com os objetivos de (1) avaliar seu efeito anticoagulante *in vitro* através do teste de tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT), (2) avaliar suas propriedades viscoelásticas na presença de K^+ e (3) produzir oligossacarídeos alditóis. O teste de aPTT da *kappa*-carragenana oxidada em diferentes graus de oxidação (DOx) e das carragenanas *iota/nu*-, *lambda*-, *iota*- e *theta*- oxidadas (com graus de oxidação totais e parciais) indicaram que a regioquímica do sulfato é importante para o efeito sinérgico dos grupos carboxila e sulfato, e que a sulfatação em C2 parece ter melhor efeito na unidade de ácido galacturônico que a sulfatação em C4. A fração KOP (DOx = 46 %) mostrou melhor atividade anticoagulante que KOT (DOx > 95 %). Resultados promissores foram alcançados, principalmente para *lambda*- e *theta*-carragenana oxidadas. Sequencialmente, foi analisado se a modificação por oxidação seletiva alteraria as propriedades gelificantes da *kappa*-carragenana por meio da reologia dinâmica oscilatória. As propriedades viscoelásticas de *kappa*-carragenana nativa e oxidada foram investigadas na presença e ausência do principal indutor da gelificação em carragenanas, o íon potássio (K^+), testado nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mol/L. Para *kappa*-carragenana nativa foi observado um aumento de G' de acordo com o aumento da concentração iônica de K^+ . O derivado oxidado apresentou comportamento de líquido, mostrando que a carboxila não contribui para a gelificação de *kappa*-carragenana. Adicionalmente, foi realizada a hidrólise ácida parcial de *kappa*-carragenana e *kappa*-carragenana oxidada com TFA 0,1 mol/L. Os oligossacarídeos foram purificados por cromatografia de troca aniônica e gel permeação. A partir de *kappa*-carragenana foram obtidos os oligossacarídeos β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol, β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol e β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol. No presente trabalho, foram isolados os oligossacarídeos inéditos: o dissacarídeo β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol e o tetrassacarídeo β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol, obtidos a partir da *kappa*-carragenana oxidada. Este trabalho mostrou o grande potencial de *kappa*-carragenana oxidada, abrindo perspectivas em relação a atividade anticoagulante dos derivados oxidados, na comparação inédita das propriedades viscoelásticas de *kappa*-carragenana nativa e oxidada e, nas diversas atividades biológicas as quais os oligossacarídeos alditóis podem ser testados, como antitumorais, antivirais, antiangiogênicas e anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Carragenanas. Oxidação seletiva. Atividade anticoagulante. Reologia. Oligossacarídeos alditóis.

ABSTRACT

Carrageenans are sulfated hydrocolloid polysaccharides extracted from red algae (Rhodophyta). Due to their gelling and viscous properties, they are used in industrial sectors such as food. In addition, they exhibit biological activities such as antitumor, antiviral, antioxidant and anticoagulant. In this work, *kappa*-carrageenan obtained from *Kappaphycus alvarezii* was selectively oxidized with TEMPO and TCCA reagents, producing β -D-galacturonic units in the polysaccharide chain in order to (1) evaluate its anticoagulant effect using Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) in vitro assay, (2) evaluate its viscoelastic properties in the presence of K^+ and (3) produce alditol oligosaccharides. The aPTT assays of oxidized *kappa*-carrageenan at different degrees of oxidation (DOx) and *iota/nu*-, *lambda*-, *iota*- and *theta*- oxidized carrageenans (with total and partial oxidation degrees) indicated that the regiochemistry of sulfate is important for the synergistic effect of the carboxyl and sulfate groups, and that C2 sulfation appears to have a better effect on the galacturonic acid unit than C4 sulfation. The KOP fraction (DOx = 46%) showed better anticoagulant activity than KOT (DOx > 95%). Promising results were achieved, mainly for oxidized *lambda*- and *theta*-carrageenans. Sequentially, it was analyzed whether selective oxidation modification would change the gelling properties of *kappa*-carrageenan through oscillatory dynamic rheology. The viscoelastic properties of native and oxidized *kappa*-carrageenan were investigated in the presence and absence of the main carrageenan gelation inducer, potassium ion (K^+), tested at concentrations of 0.1, 0.5 and 1 mol/L. For native *kappa*-carrageenan an increase of G' was observed according to the increase of the ionic concentration of K^+ . The oxidized derivative showed liquid behavior, showing that carboxyl does not contribute to *kappa*-carrageenan gelation. Additionally, partial acid hydrolysis of oxidized *kappa*-carrageenan and *kappa*-carrageenan with 0.1 mol/L TFA was performed. The oligosaccharides were purified by anion-exchange and size-exclusion chromatography. The β -D-Galp-4-sulfate-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro-D-galactitol, β -D-Galp-4-sulfate-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfate-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro- α -D-galactitol and β -D-Galp-4-sulfate-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfate-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfate-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro-D-galactitol oligosaccharides were obtained from *kappa*-carrageenan. In the present work, two unpublished oligosaccharides were isolated from oxidized *kappa*-carrageenan: β -D-GalAp-4-sulfate-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro-D-galactitol disaccharide and β -D-GalAp-4-sulfate-tetrasaccharide(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalAp-4-sulfate-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro-D-galactitol. This work showed the great potential of oxidized carrageenans, opening perspectives regarding the anticoagulant activity of oxidized derivatives, in the unprecedented comparison of the viscoelastic properties of native and oxidized *kappa*-carrageenan and, in many biological activities to which alditols oligosaccharides can be tested, as antitumor, antiviral, antigenic and anti-inflammatory.

Keywords: Carrageenans. Selective oxidation. Anticoagulant activity. Rheology. Oligosaccharides alditols.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURAS DISSACARÍDICAS DE GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS. R= H, SO ₃ ⁻	28
FIGURA 2 - VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DO MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO	33
FIGURA 3 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA DE LIGAÇÃO À ANTITROMBINA.....	35
FIGURA 4 - REAÇÃO GERAL DA OXIDAÇÃO DE ÁLCOOIS PRIMÁRIOS EM POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO.....	39
FIGURA 5 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO SELETIVA DE UM ÁLCOOL PRIMÁRIO UTILIZANDO TCCA COMO COOXIDANTE.	40
FIGURA 6 - ESQUEMA DA MUDANÇA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL APÓS A OXIDAÇÃO SELETIVA.....	41
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA GELIFICAÇÃO DE CARRAGENANAS.....	44
FIGURA 8 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES κN, ι/νN, λN, ιN, θN E SEUS DERIVADOS OXIDADOS.	50
FIGURA 9 - ESQUEMA DAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	56
FIGURA 10 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DAS FRAÇÕES κN (1), ι/νN (2), ιN (3), λN (4) E θN (5).....	67
FIGURA 11 - OXIDAÇÃO SELETIVA C6 DE KN UTILIZANDO TEMPO E TCCA. .	68
FIGURA 12 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DOS DERIVADOS OXIDADOS κOT (1), ι/νOT (2), ιOT (3), λOT (4) E θOT (5) UTILIZANDO O SISTEMA TEMPO/TCCA.....	69
FIGURA 13 - PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) PARA AS AMOSTRAS a) κN, κOP E κOT, b) ι/νN E ι/νOT, c) ιN, ιOP E ιOT, d) λN, λOP E λOT E e) θN, θOP E θOT.....	72
FIGURA 14 - ESTRUTURAS DAS FRAÇÕES κN, κOP, κOT, ι/νN, ι/νOT, ιN, ιOT, λN, λOP, λOT, θN, θOP E θOT.....	73
FIGURA 15 - DEPENDÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRA NECESSÁRIA PARA TRIPLICAR O APTT DA SOLUÇÃO SALINA (CaPTT ₃) EM FUNÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO (DO _x).	77

FIGURA 16 - ATIVIDADE DE <i>LAMBDA</i> - E <i>THETA</i> -CARRAGENANAS NATIVAS E OXIDADAS.....	80
FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN ¹ H DA FRAÇÃO K OBTIDA A PARTIR DA EXTRAÇÃO PREPARATIVA DA ALGA <i>K. ALVAREZII</i>	81
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN ¹ H DA FRAÇÃO KR (a) E KO _x (b).	83
FIGURA 19 - PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) (–) E ESPALHAMENTO DE LUZ LASER EM MULTIÂNGULOS (MALLS) (–) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN) DAS FRAÇÕES K (a) E KO (b).....	83
FIGURA 20 - VARREDURAS DE TENSÃO EXECUTADAS EM MODO CS DE 0,02 – 10 Pa PARA AS AMOSTRAS K E KO _x EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE K ⁺	85
FIGURA 21 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS K, K-0,1K, K-0,5K E K-1K	87
FIGURA 22 - G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DA FRAÇÃO K.....	88
FIGURA 23 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS K, K-0,1K, K-0,5K E K-1K APÓS RAMPAS DE TEMPERATURA.....	92
FIGURA 24 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA ANTES E APÓS AS RAMPAS DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS KO _x , KO _x -0,1K, KO _x -0,5K E KO _x -1K.....	93
FIGURA 25 - MÓDULO ELÁSTICO (G') EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE KCl.	96
FIGURA 26 - MÓDULO ELÁSTICO (G') EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE KCl APÓS RAMPAS DE TEMPERATURA.	98
FIGURA 27 - G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DA FRAÇÃO K E KO _x NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS CÁTIOS K ⁺ E Ca ²⁺	99
FIGURA 28 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE K E KO _x NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE K ⁺	101
FIGURA 29 - OXIDAÇÃO C6 SELETIVA DA AMOSTRA K.....	103
FIGURA 30 - ESPECTROS DE RMN ¹ H DAS AMOSTRAS K, KR E KO.	104

FIGURA 31 - MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL HETERONUCLEAR ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DA FRAÇÃO KO.....	105
FIGURA 32 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DE κ -CARRAGENANA OXIDADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	106
FIGURA 33 - QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES REDUTORAS DE KOx FORMADAS PARA A CONDIÇÃO C3 UTILIZANDO RMN DE ^1H ..	109
FIGURA 34 - PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS OXIDADOS VIA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA AMOSTRA KO.	111
FIGURA 35 - ESPECTROS DE RMN ^1H DAS AMOSTRAS KO _h , KO _{hr} , KO _{hb} E KO _{hbr}	112
FIGURA 36 - OBTENÇÃO DAS SUBFRAÇÕES PRODUZIDAS A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE K E KO.....	113
FIGURA 37 - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO KO _{hr}	114
FIGURA 38 - ESPECTROS DE RMN ^1H DAS AMOSTRAS KO, KO _{HRI} , KO _{HRII} E KO _{HRIII}	115
FIGURA 39 - MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO (a) E ^1H - ^1H -COSY (b) DE KO _{HRII}	116
FIGURA 40 - ESPECTROS DE ESI-MS (MODO NEGATIVO) DA FRAÇÃO KO _{HRII}	119
FIGURA 41 - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO KO _{hbr}	120
FIGURA 42 - ESPECTROS DE RMN ^1H DAS AMOSTRAS KO _{HBRI} , KO _{HBRII} , KO _{HBRIII} , KO _{HBRIV} E KO _{HBREV}	121
FIGURA 43 - MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DE KO _{HBRIV}	122
FIGURA 44 - ESPECTROS DE ESI-MS (MODO NEGATIVO) DA FRAÇÃO KO _{HBRIV}	123
FIGURA 45 - PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS VIA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA AMOSTRA K.	124
FIGURA 46 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES K, K _h E K _{hr}	125
FIGURA 47 - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO K _{hr}	126

FIGURA 48 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS SUBFRAÇÕES KHRI, KHRII E KHRIII.....	128
FIGURA 49 - MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DAS SUBFRAÇÕES KHRI (a), KHRII (b) E KHRIII (c).	129
FIGURA 50 - ESPECTROS DE ESI-MS (MODO NEGATIVO) DAS FRAÇÕES KHRI (a), KHRII (b) E KHRIII (c).....	132

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DE CARRAGENANAS.....	30
TABELA 2 - TEMPO DE RETENÇÃO, M_w E PARÂMETROS DAS CURVAS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO.....	60
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E DAS DÍADES, RENDIMENTO, CONTEÚDO DE SULFATO E MASSA MOLAR MÉDIA (M_w) DAS CARRAGENANAS κN , I/VN , IN , λN , E θN	66
TABELA 4 - DOX, MASSA MOLAR (M_w) E ANÁLISE QUÍMICA DAS CARRAGENANAS C6 OXIDADAS.....	68
TABELA 5 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE 1H E ^{13}C DAS DÍADES DAS CARRAGENANAS NATIVAS E OXIDADAS.....	70
TABELA 6 - TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO (aPTT) DAS FRAÇÕES κN , κOP , κOT , I/VN , I/VOT , IN , IOT , λN , λOP , λOT , θN , θOP E θOT	75
TABELA 7 - PARÂMETROS REOLÓGICOS	95
TABELA 8 - ESTUDO DA HIDRÓLISE ACIDA PARCIAL DE KO EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	110
TABELA 9 - ASSINALAMENTOS DE RMN DE 1H E ^{13}C DO DISSACARÍDEO β -D- GALAP-4-SULFATO-(1→4)-3,6-ANIDRO-D-GALACTITOL (KOHRII)	118
TABELA 10 - ASSINALAMENTOS DE RMN DE 1H E ^{13}C DOS OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS OBTIDOS A PARTIR DA κ - CARRAGENANA.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADTM	- análises dinâmicas termomecânicas
aPTT	- tempo de tromboplastina parcial ativada
AT	- antitrombina
CaPTT ₃	- concentração necessária para triplicar o valor normal do aPTT
COSY	- (<i>correlation spectroscopy</i>) Experimento de RMN homonuclear bidimensional que revela acoplamentos geminais e vicinais ¹ H- ¹ H
CS	- tensão controlada
D ₂ O	- água deuterada
DS	- grau de substituição para sulfatação
DOx	- grau de substituição para oxidação
equi.	- equivalentes
ESI-MS	- espectrometria de massas com ionização electrospray
FTIR	- infravermelho com transformada de Fourier
G'	- módulo de armazenamento ou elástico
G''	- módulo de perda ou viscoso
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GLC-FID	- cromatografia líquida gasosa com detector de ionização de chama
h	- horas
HCII	- cofator II da heparina
HCO ₃ ⁻ /CO ₃ ⁻²	- tampão bicarbonato
HPSEC	- cromatografia de exclusão por tamanho de alto eficiência
HPV	- Papilomavírus humano
HSV-1	- Vírus herpes simplex 1
HSV-2	- Vírus herpes simplex 2
HSQC-ED	- (<i>heteronuclear single quantum coherence – editing</i>) Experimento de RMN heteronuclear bidimensional que detecta acoplamento vicinal ¹ H- ¹³ C editado com os grupos CH ₂ em fase oposta a grupos CH e CH ₃
KDa	- Kilodaltons
LPH	- Laboratório de pesquisas hidrogeológicas
LMWH	- heparina de baixa massa molar
m/z	- relação entre massa e carga

MALLS	- espalhamento de luz laser em multiângulos
MEV	- microscopia eletrônica de varredura
Mw	- massa molar média ponderal em peso
NaBH ₄	- borohidreto de sódio
NaCl	- cloreto de sódio
NaHCO ₃	- bicarbonato de sódio
Na ₂ CO ₃	- carbonato de sódio
NaN ₃	- azida de sódio
NaNO ₂	- nitrito de sódio
n.d.	- não detectado
(NH ₄) ₂ CO ₃	- carbonato de amônio
n.o.	- não observado
RI	- Índice de refração
RMN	- ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	- ressonância magnética nuclear de de Carbono treze
RMN ¹ H	- ressonância magnética nuclear de Hidrogênio um
rpm	- rotações por minuto
TCCA	- ácido tricloroisocianúrico
TEMPO	- N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
TFA	- ácido trifluoracético
Tg	- temperatura de gelificação
Tf	- temperatura de fusão
UFH	- heparina não fracionada
Xa	- Fator X ativado
a1	- Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 1 h na temperatura de 55 °C
a2	- Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 2 h na temperatura de 55 °C
a3	- Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 3 h na temperatura de 55 °C
a4	- Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 4 h na temperatura de 55 °C

- a5 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 5 h na temperatura de 55 °C
- a6 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 6 h na temperatura de 55 °C
- a7 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 7 h na temperatura de 55 °C
- a8 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 8 h na temperatura de 55 °C
- b1 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 1 h na temperatura de 65 °C
- b2 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 2 h na temperatura de 65 °C
- b3 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 3 h na temperatura de 65 °C
- b4 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 4 h na temperatura de 65 °C
- b5 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 5 h na temperatura de 65 °C
- b6 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 6 h na temperatura de 65 °C
- b7 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 7 h na temperatura de 65 °C
- b8 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 8 h na temperatura de 65 °C
- c1 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 1 h na temperatura de 85 °C
- c2 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 2 h na temperatura de 85 °C
- c3 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 3 h na temperatura de 85 °C
- c4 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 4 h na temperatura de 85 °C
- c5 - Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 5 h na temperatura de 85 °C

c6	- Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 6 h na temperatura de 85 °C
c7	- Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 7 h na temperatura de 85 °C
c8	- Produto da hidrólise ácida parcial de KO por 8 h na temperatura de 85 °C
δ	- deslocamento químico
κ	- <i>kappa</i> -carragenana
K	- Fração de <i>kappa</i> -carragenana obtida de <i>Kappaphycus alvarezii</i>
κN	- Fração de <i>kappa</i> -carragenana obtida por Araújo et al. (2013) e Ducatti et al. (2011)
KR	- Fração de <i>kappa</i> -carragenana reduzida obtida após a redução da fração K
K-0,1K	- Fração obtida pela adição de 0,1 mol/L de KCl na fração K
K-0,5K	- Fração obtida pela adição de 0,5 mol/L de KCl na fração K
K-1K	- Fração obtida pela adição de 1 mol/L de KCl na fração K
KH	- Fração obtida da hidrólise de K em TFA, 3 h, 65 °C
Khr	- Fração reduzida de Kh
KHRI	- Fração purificada de Khr eluida na concentração de 0,05 mol/L de carbonato de amônio na cromatografia de troca iônica
KHRII	- Fração purificada de Khr eluida na concentração de 0,075 mol/L de carbonato de amônio na cromatografia de troca iônica
KHRIII	- Fração purificada de Khr eluida na concentração de 0,125 mol/L de carbonato de amônio na cromatografia de troca iônica
KO	- (<i>Kappa</i> Oxidada) obtida após oxidação seletiva por 4 horas da fração KR
KOx-0,1K	- Fração obtida pela adição de 0,1 mol/L de KCl na fração KO
KOx-0,5K	- Fração obtida pela adição de 0,5 mol/L de KCl na fração KO
KOx-1K	- Fração obtida pela adição de 1 mol/L de KCl na fração KO
KOh	- Fração obtida da hidrólise de KO em TFA, 3 h, 85 °C
KOhr	- Fração reduzida de KOh
KOHRII	- Fração purificada de KOhr eluida na concentração de 0,075 mol/L de carbonato de amônio na cromatografia de troca iônica
KOhb	- Fração obtida da hidrólise de KOh em TFA, 5 h, 65 °C

KOhbr	- Fração reduzida de KOhb
KOHBRIII	- Fração purificada de KOhbr eluída na concentração de 0,175 mol/L de carbonato de amônio na cromatografia de troca iônica
KOx	- (<i>Kappa</i> Oxidada) Fração obtida após oxidação seletiva em 6 horas da fração KR
κ OP	- (<i>Kappa</i> Oxidada Parcial) Fração obtida após a oxidação seletiva em 15 h da fração κ N (SANTOS, 2015)
κ OT	- (<i>Kappa</i> Oxidada Total) Fração obtida após oxidação seletiva em 2 h da fração κ N (SANTOS, 2015)
I/v	- <i>Iota/nu</i> -carragenana
I/vN	- Fração de <i>Iota/nu</i> -carragenana obtida da extração de <i>Eucheuma denticulatum</i> (SANTOS, 2015)
I/vOT	- (<i>Iota/nu</i> Oxidada Total) Fração obtida após a oxidação seletiva por 15 horas da fração I/vN
I	- <i>Iota</i> -carragenana
IN	- Fração de <i>Iota</i> -carragenana obtida após tratamento alcalino da fração I/vN (SANTOS, 2015)
IOT	- (<i>Iota</i> Oxidada Total) Fração obtida após oxidação seletiva por 2 h da fração IN (SANTOS, 2015)
λ	- <i>Lambda</i> -carragenana
λ N	- Fração de <i>lambda</i> -carragenana obtida por Araújo et al. (2013) da extração de <i>Gigartina skottsbergii</i> .
λ OP	- (<i>Lambda</i> Oxidada Parcial) Fração obtida após oxidação seletiva por 2 h da fração λ N (SANTOS, 2015)
λ OT	- (<i>Lambda</i> Oxidada Total) Fração obtida após oxidação seletiva por 15 h da fração λ N (SANTOS, 2015)
θ	- <i>Theta</i> -carragenana
θ N	- Fração de <i>theta</i> -carragenana obtida após tratamento alcalino da fração λ N (SANTOS, 2015)
θ OP	- (<i>Theta</i> Oxidada Parcial) Fração obtida após oxidação seletiva por 2 horas da fração θ N (SANTOS, 2015)
θ OT	- (<i>Theta</i> Oxidada Total) Fração obtida após oxidação seletiva por 15 h da fração θ N (SANTOS, 2015)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 JUSTIFICATIVA	25
1.2 OBJETIVOS	26
1.2.1 Objetivo geral	26
1.2.2 Objetivos específicos.....	26
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS	28
2.2 CARRAGENANAS	29
2.3 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE.....	32
2.3.1 Coagulação sanguínea.....	32
2.3.1.1 Avaliação laboratorial da coagulação <i>in vitro</i>	34
2.3.2 A heparina e a busca por heparino-miméticos a partir de polissacarídeos sulfatados.....	34
2.4 OXIDAÇÕES EM CARRAGENANAS.....	38
2.5 REOLOGIA APLICADA AOS SISTEMAS CONTENDO CARRAGENANAS.....	42
2.6 HIDRÓLISE DE CARRAGENANAS	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 ORIGEM E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES κ N, ι /vN, λ N, ι N E θ N.....	48
3.2 ORIGEM E OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K.....	48
3.3 REDUÇÃO DA FRAÇÃO K E OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KR.....	48
3.4 OXIDAÇÃO SELETIVA DE CARRAGENANAS	49
3.5 ANÁLISES REOLÓGICAS DINÂMICO OSCILATÓRIAS.....	53
3.5.1 Varreduras de tensão.....	54
3.5.2 Varreduras de frequência.....	54
3.5.3 Análises dinâmicas termomecânicas (ADTM)	54
3.5.4 Análise da temperatura de gelificação e fusão.....	55
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES REOLÓGICAS DINÂMICO OSCILATÓRIAS.....	55
3.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i>	56
3.8 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO K E KO PARA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS.....	56

3.8.1 Métodos cromatográficos aplicados na purificação dos oligossacarídeos alditóis	58
3.8.1.1 Cromatografia em coluna aniônica	58
3.8.1.2 Cromatografia de exclusão.....	58
3.8.1.3 Conversão do contraíon amônio para sódio.....	59
3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS	59
3.9.1 Análise por cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos e índice de refração (HPSEC-RI/MALLS).....	59
3.9.1.1 Determinação da homogeneidade	59
3.9.1.2 Determinação da massa molar relativa	60
3.9.2 Determinação de ácido urônico.....	60
3.9.3 Determinação do grau de sulfatação (DSSulfatação)	61
3.9.4 Quantificação de carboidratos totais	61
3.9.5 Quantificação de 3,6-Anidrogactose.....	62
3.9.6 Determinação da composição monossacarídica	62
3.10 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	62
3.10.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	62
3.10.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	63
3.10.3 Espectrometria de massas do tipo Electrospray	63
3.10.4 Espectrometria de absorção atômica por chama (fotometria de chama)	63
3.10.5 Microscopia eletrônica de Varredura.....	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 EFEITOS DO GRUPO CARBOXÍLICO NA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE CARRAGENANAS OXIDADAS.....	65
4.1.1 Origem, obtenção e caracterização das carragenanas <i>kappa-</i> , <i>iota/nu-</i> , <i>iota-</i> , <i>lambda-</i> e <i>theta-</i>	65
4.1.2 Oxidação seletiva das frações κN , $\iota/\nu N$, ιN , θN e λN	67
4.1.3 Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> das carragenanas <i>kappa-</i> , <i>iota/nu-</i> , <i>iota-</i> , <i>lambda-</i> , <i>theta-</i> e seus derivados oxidados.....	72
4.2 EFEITO DA OXIDAÇÃO SELETIVA C6 NAS PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS DE <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA.....	81
4.2.1 Origem e extração da <i>kappa</i> -carragenana (Amostra K).....	81
4.2.2 Redução e oxidação seletiva da amostra K	82

4.2.3 Análise de homogeneidade por HPSEC-RI/MALLS	83
4.2.4 Análise elementar.....	84
4.2.5 Análises reológicas oscilatórias.....	85
4.2.6 Microscopia eletrônica de Varredura	101
4.3 PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA C6 OXIDADA.....	103
4.3.1 Obtenção e oxidação C6 seletiva da fração KR	103
4.3.2 Produção de oligossacarídeos alditóis a partir de KO	106
4.3.3 Purificação de KOhr e caracterização dos oligossacarídeos alditóis isolados.....	113
4.3.4 Purificação de KOhbr e caracterização dos oligossacarídeos alditóis isolados	119
4.3.5 Produção de oligossacarídeos alditóis a partir de κ -carragenana (K)	124
4.3.6 Purificação e caracterização dos oligossacarídeos alditóis derivados de κ - carragenana	126
5 CONCLUSÕES	134
REFERÊNCIAS	136
ANEXO 1.....	151
ANEXO 2.....	181

1 INTRODUÇÃO

Este projeto de doutorado faz parte dos trabalhos desenvolvidos no Grupo de Pesquisa em Modificação Química de Polissacarídeos de Algas, vinculado ao Laboratório de Glicobiologia Estrutural de Algas da UFPR que possui 30 anos de experiência em carragenanas.

As carragenanas são polissacarídeos naturalmente sulfatados obtidos de algas vermelhas, os quais apresentam propriedades biológicas e físico-químicas de interesse alimentício e biotecnológico. Atualmente apresentam a maior produção global (60 mil toneladas por ano) em comparação com o ágar e o alginato, outros polissacarídeos extraídos de algas (GHANBARZADEH; GOLMORADIZADEH; HOMAEI, 2018).

Devido ao seu caráter gelificante e viscosante, as carragenanas são fortemente utilizadas na indústria. Ainda apresentam atividades biológicas que estão relacionadas com parâmetros estruturais como a massa molar, grau e padrão de sulfatação (ARAÚJO et al., 2013).

As modificações químicas em carragenanas, como por exemplo a inserção da carboxila (COSENZA et al., 2015), visam produzir macromoléculas com aplicações biológicas e/ou biotecnológicas superiores e/ou novas em relação aos polissacarídeos originais. Na tentativa de produzir modificações regioseletivas para correlacionar a estrutura da carragenana com o efeito biológico, foi dado continuidade ao trabalho de SANTOS (2015) com as reações de oxidação seletiva de hidroxilas primárias (C6), utilizando o sistema TEMPO/TCCA. O derivado oxidado produzido foi aplicado em três principais frentes, na avaliação do efeito anticoagulante, no estudo reológico da *kappa*-carragenana nativa e C6 oxidada na presença do íon potássio, e na produção de oligossacarídeos alditóis oxidados.

O agente anticoagulante mais utilizado na clínica médica é a heparina, no entanto, seu uso está relacionado à efeitos adversos, como por exemplo, hemorragia e necrose cutânea, além de risco de contaminação por patógenos. Assim, a busca por materiais com origem não animal com atividade anticoagulante é um tema de relevante importância, principalmente dentro da Glicobiologia. Levando isso em consideração, os derivados oxidados de *kappa*-carragenana e das carragenanas *iota/nu-*, *iota-*, *lambda-* e *theta-* obtidas previamente, possuindo diferentes padrões de sulfatação e graus de oxidação (SANTOS, 2015) foram

avaliadas quanto a atividade anticoagulante *in vitro*. Esta parte da tese foi publicada na revista Carbohydrate Polymers (SANTOS-FIDENCIO et al., 2019) (ANEXO 1).

Na segunda frente do trabalho, análises reológicas podem ser utilizadas para a caracterização do comportamento de formulações e misturas (LIPPACHER; MULLER; MADER, 2004). Com esse intuito, foi avaliado o efeito da oxidação seletiva nas propriedades viscoelásticas da *kappa*-carragenana nativa e oxidada, na presença de íons potássio nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mol/L, realizado no laboratório de reologia da UFPR, sob a coorientação da Profa Dra Joana Léa Meira Silveira. A microestrutura também foi visualizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, com o auxílio da Profa Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco.

Concluindo, a terceira frente do trabalho consistiu na produção de oligossacarídeos alditóis via hidrólise ácida parcial a partir da *kappa*-carragenana C6 oxidada, realizada na National University of Ireland, Galway, Irlanda, durante o estágio sanduíche. Sob a supervisão dos Professores Zoe Popper e Paul Murphy, foram produzidos e purificados oligossacarídeos obtidos de *kappa*-carragenana e pela primeira vez, oligossacarídeos obtidos do derivado C6 oxidado.

1.1 JUSTIFICATIVA

As carragenanas são obtidas de certas espécies de algas vermelhas, uma fonte sustentável e abundante de matéria-prima, que biossintetizam polissacarídeos sulfatados, os quais apresentam propriedades biológicas e físico-químicas de interesse industrial, principalmente alimentício. Dentre as carragenanas, a *kappa* possui a maior importância comercial e de estrutura menos complexa em comparação com outras carragenanas. Diante disso, se torna um bom substrato para modificações químicas, que visam a produção de macromoléculas com aplicações biológicas e/ou biotecnológicas superiores em relação aos polissacarídeos originais.

A oxidação seletiva é uma reação direta, de baixo custo, que envolve reagentes de baixa toxicidade, e que produz ácidos urônicos na estrutura polissacarídica. Deste modo, a oxidação seletiva se mostra um método eficiente para alterar a estrutura da *kappa*-carragenana. A heparina, anticoagulante de referência, apresenta efeitos colaterais e risco de contaminações por patógenos. Como carragenanas apresentam efeito anticoagulante devido a presença de grupos sulfato (ARAÚJO et al., 2013), e, grupos carboxílicos contribuem para esta atividade (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986; PAREDES-GAMERO et al., 2012), buscou-se investigar a importância da regioquímica do sulfato na presença do ácido galacturônico na atividade anticoagulante de carragenanas oxidadas.

A *kappa*-carragenana é conhecida por suas propriedades gelificantes. Assim, análises reológicas são relevantes na caracterização do novo derivado oxidado. Dessa forma, objetivou-se avaliar as propriedades viscoelásticas da *kappa*-carragenana nativa e do derivado oxidado na presença do principal indutor da gelificação em *kappa*-carragenana, o íon potássio (K^+) (WANG et al., 2018), e assim, avaliar qual o papel da carboxila nas propriedades reológicas das carragenanas.

Carragenanas podem ser degradadas em estruturas de menor massa molar, as quais possuem potencial biológico, propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas promissoras. Neste contexto, a produção de oligossacarídeos por hidrólise ácida tem destaque por manter o grupo sulfato na estrutura polimérica. Assim, levando em consideração que já existe amplo estudo com oligossacarídeos alditóis obtidos de *kappa*-carragenana (GONÇALVES et al. 2005; DUCATTI et al. 2011; FIGUEIREDO et al. 2019), foi produzido pela primeira vez oligossacarídeos

alditóis via hidrólise ácida parcial a partir da *kappa*-carragenana C6 oxidada, os quais apresentam potenciais usos como antitumorais, antivirais, antigigênicos e anti-inflamatórios (YUAN et al., 2005; CHEN et al., 2007; WANG et al., 2011; KALITNIK et al., 2016; CALVO et al., 2019; GROULT et al., 2019).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto foi realizar a oxidação seletiva da *kappa*-carragenana para avaliar (1) o seu efeito anticoagulante e de derivados oxidados obtidos previamente das carragenanas *iota*-, *theta*-, *lambda*- e híbrido *iota/nu*, (2) avaliar suas propriedades viscoelásticas e, (3) produzir oligossacarídeos alditóis.

1.2.2 Objetivos específicos

1.2.2.1 Realizar a oxidação seletiva da *kappa*-carragenana produzida por *Kappaphycus alvarezii* e caracterizar os produtos oxidados;

1.2.2.2 Testar a atividade anticoagulante *in vitro* dos derivados oxidados obtidos previamente das carragenanas *kappa*-, híbrido *iota/nu*-, *iota*-, *lambda*- e *theta*-, obtidas de *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottisbergii*.

1.2.2.3 Determinar as massas molares relativas dos polissacarídeos isolados e quimicamente modificados utilizando o HPSEC;

1.2.2.4 Avaliar a relação estrutura e atividade anticoagulante das carragenanas nativas e oxidadas;

1.2.2.5 Investigar por meio da reologia as características viscoelásticas e/ou gelificantes dos géis de *kappa*-carragenana de *K. alvarezii* nativa e C6 oxidada, na presença e ausência do íon potássio (K⁺);

1.2.2.6 Produzir, isolar, purificar e caracterizar oligossacarídeos alditóis obtidos por hidrólise ácida parcial a partir da *kappa*-carragenana nativa e C6 oxidada.

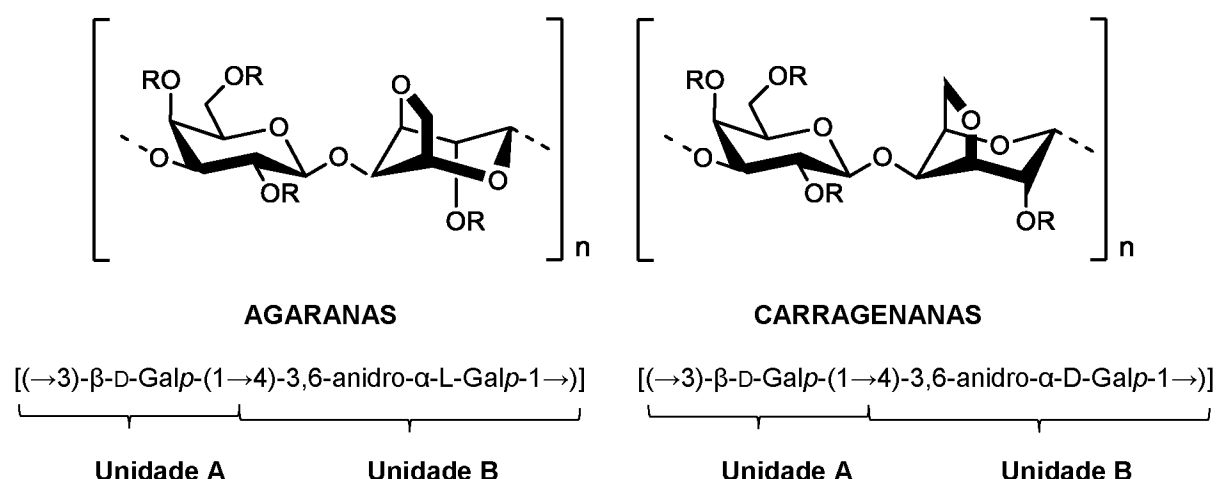
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS

Os polissacarídeos obtidos de algas vermelhas (Rhodophyta), como *Chondrus crispus*, *Gigartina stellate*, *Eucheama spp.*, *Hypnea musciformis*, *Sarconema furcellatum* e *Kappaphycus spp.* (GRAHAM; WILCOX, 2000; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013) são chamados galactanas. A parede celular destas algas é composta por um componente fibrilar rígido constituído de celulose, e um amorfo. A matriz amorfa pode corresponder a até 70% do peso seco da alga e é formada por uma gama estrutural diversificada de polissacarídeos (D-xilose, D-glucose, D-ácido glucorônico e, principalmente galactose) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A estrutura química das galactanas apresenta uma estrutura linear formada por unidades repetitivas de β-D-galactopiranoose ligadas glicosidicamente através das ligações (1→3) (unidade A) e α-galactopiranoose ligadas (1→4) (unidade B, frequentemente na forma de 3,6-anidrogalactose). Assim, as galactanas formam um arranjo alternado entre as unidades A e B, ou seja, (AB)_n (FIGURA 1).

FIGURA 1 - ESTRUTURAS DISSACARÍDICAS DE GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS. R= H, SO₃⁻



FONTE: O autor (2019).

De acordo com a estereoquímica da unidade B, as galactanas podem ser classificadas como agaranas, pertencentes à série enantiomérica L-, e carragenanas quando pertence à série D- (PAINTER, 1983). Existem ainda as galactanas do tipo

híbridas, onde a unidade B pode pertencer tanto a série D como L (STORTZ; CERREZO, 2000).

A presença das unidades anidrogactosídicas conferem aos polissacarídeos de algas vermelhas propriedades viscosantes ou gelificantes (USOV, 1992, 2011; RENN, 1997) com elevada capacidade de formação de géis, sendo denominados ficocolóides ou hidrocolóides. Essa característica faz com que estes biopolímeros sejam explorados economicamente (USOV, 2011; GRAHAM; WILCOX, 2000). Em 2015, ágars e carragenanas movimentaram um valor de US\$ 817 milhões de dólares, sendo a produção mundial de carragenanas de 60 mil toneladas por ano, contribuindo com o mercado bruto em 626 milhões de dólares (RHEIN-KNUDSEN; ALE; MEYER, 2015).

A formação das unidades de 3,6-anidrogactose ocorre por catálise enzimática ou por ciclização promovida por base com a eliminação simultânea de um grupo sulfato em C6 e um próton do grupo hidroxila em C3 da unidade 4-O-ligada (JONES; PEAT, 1942; REES, 1961).

Em relação à nomenclatura das unidades monossacarídicas, Knutsen e colaboradores (1994) propuseram uma notação para se referir as estruturas repetitivas das agaranas e das carragenanas, onde a letra G corresponde a unidade (1→3)-β-D-galactopiranoose, as letras D e L referem-se respectivamente as unidades 4-O-ligadas α-D-galactopiranoose e α-L-galactopiranoose, e as letras DA e LA, aos respectivos derivados 3,6-anidro-α-galactopiranoose. Os grupos substituintes foram definidos como M para metil éter, P para piruvato (4,6-O-(1'-carboxietilideno)), S para éster sulfato, sendo que a substituição no monossacarídeo é dada pelo número do carbono ao qual o grupo está ligado (KNUTSEN et al., 1994; LAHAYE, 2001).

Vários grupos hidroxil de agaranas e carragenanas podem estar sulfatados ou metilados, ou ainda substituídos por 4,6-O-(1'-carboxietilideno) e algumas vezes por monossacarídeos adicionais como D-xilose, mono-O-metilgactose e ácido D-glucurônico (USOV, 2011; GRAHAM; WILCOX, 2000).

2.2 CARRAGENANAS

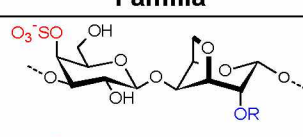
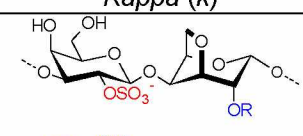
Carragenanas são encontradas na parede celular e matrix intercelular em espécies do gênero *Kappaphycus*, *Hypnea*, *Eucheuma*, *Gigartina* e *Chondrus*, compreendendo até 50 % de seu peso seco (KLOAREG; QUATRANO, 1988; DE

RUITER; RUDOLPH, 1997; RHEIN-KNUDSEN; ALE; MEYER, 2015). Estes polissacarídeos são constituídos de uma estrutura dissacarídica repetitiva composta por uma unidade β -D-galactopiranosose ligada a α -D-galactopiranosose ou 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (FIGURA 1).

A classificação de carragenanas varia de acordo com seu padrão de sulfatação e com a presença ou ausência da 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose. Já foram identificadas 15 estruturas diferentes (LAHAYE, 2001) ocorrendo em diferentes combinações e podendo variar entre espécies e diferentes estágios de vida das algas vermelhas (GRAHAM; WILCOX, 2000).

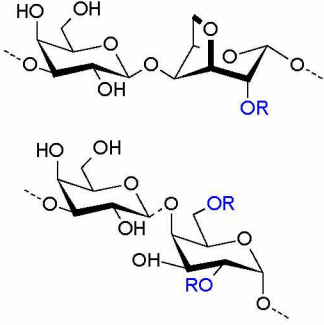
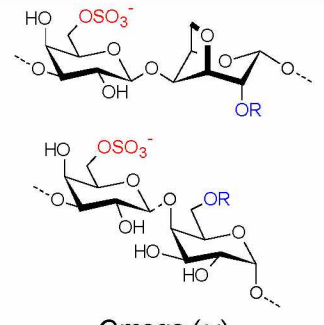
A denominação de carragenanas foi realizada utilizando letras gregas dependendo da quantidade e da posição dos grupos sulfato na unidade de β -D-galactopiranosose, sendo denominadas, λ (lambda), κ (kappa), ι (iota), ν (nu), μ (mu), θ (theta) e ξ (Ksi) (McHUGH, 1987) e divididas em quatro famílias denominadas Kappa, Lambda, Beta (GREER; YAPHE; 1984) e Ômega (MOLLION; MOREAU; CHRISTIAN, 1986). A Família Kappa (κ) possui grupos sulfato em C4; na Família Lambda (λ) os grupos sulfato substituem C2; na Família Ômega (ω) o grupo sulfato está em C6 e a Família Beta (β) não possui grupos sulfato. (KNUTSEN et al., 1994). Na TABELA 1 são mostradas as 15 díades repetitivas.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DE CARRAGENANAS

Estruturas ^a		(\rightarrow 3)-O- β -D-Galp Unidade A	(\rightarrow 4)-O- α -D-Galp Unidade B	Código de letras
Família	Subtipo			
 Kappa (κ)	<i>k</i> (kappa)	β -D-Galp-4-sulfato	3,6-anidro- α -D-Galp	G4S-DA
	ι (iota)	β -D-Galp-4-sulfato	3,6-anidro- α -D-Galp-2-sulfato	G4S-DA2S
	μ (mu)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-Galp-6-sulfato	G4S-D6S
	ν (nu)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-Galp-2,6-dissulfato	G4S-D2S, 6S
	o (omicron)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-Galp-2-sulfato	G4S-D2S
 Lambda (λ)	λ Lambda	β -D-Galp-2-sulfato	α -D-Galp-2,6-dissulfato	G2S-D2S, 6S
	ξ (xi)	β -D-Galp-2-sulfato	α -D-Galp-2-sulfato	G2S-D2S
	θ (theta)	β -D-Galp-2-sulfato	3,6-anidro- α -D-Galp-2-sulfato	G2S-DA2S
	π (pi)	β -D-Galp-4,6-O-(1-carboxietilideno)	α -D-Galp-2-sulfato	GP-D2S

(continua)

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DE CARRAGENANAS

Estruturas ^a		(conclusão)		
Família	Subtipo	(→3)-O-β-D-Galp Unidade A	(→4)-O-α-D-Galp Unidade B	Código de letras
 <p><i>Beta (β)</i></p>	(β) <i>Beta</i>	β-D-Galp	3,6-anidro-α-D-Galp	G-DA
	α (<i>alfa</i>)	β-D-Galp	3,6-anidro-α-D-Galp-2-sulfato	G-DA2S
	γ (<i>gamma</i>)	β-D-Galp	α-D-Galp-6-sulfato	G-D6S
	δ (<i>delta</i>)	β-D-Galp	α-D-Galp-2,6-dissulfato	G-D2S, 6S
 <p><i>Omega (ω)</i></p>	(ω) <i>Omega</i>	β-D-Galp-6-sulfato	3,6-anidro-α-D-Galp	G6S-DA
	ψ (<i>psi</i>)	β-D-Galp-6-sulfato	α-D-Galp-6-sulfato	G6S-D6S

FONTE: O autor (2019).

NOTA: ^aEsta classificação refere-se ao homopolímero ideal. O polímero real pode apresentar uma estrutura química heterogênea e um conteúdo de sulfato diferente do esperado, que é dependente da fonte da alga, seu estágio de vida, e o método de extração ou processamento do polissacarídeo (GRAHAM; WILCOX, 2000).

Comercialmente, as três carragenanas mais exploradas são a *kappa* (κ), *iota* (ι) e *lambda* (λ). κ- e ι-carragenanas são gelificantes, espessantes e emulsificantes, enquanto λ-carragenana é caracterizada como espessante. Devido a biocompatibilidade e as características físico-químicas citadas, são muito utilizadas nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (VAN DE VELDE et al., 2001; GHANBARZADEH; GOLMORADIZADEH; HOMAEI, 2018). Exemplos da utilização de carragenanas incluem queijo cottage, pudins, sobremesas lácteas, cremes cosméticos e creme dental (McHUGH, 2003; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Além da utilização industrial, as carragenanas apresentam atividades biológicas. Alguns estudos *in vitro* mostram que carragenanas podem ter efeito antiviral pela inibição da replicação dos vírus da hepatite A, influenza A, herpes e dengue ligando diretamente ao vírus (DE SF-TISCHER et al. 2006; PUJOL et al. 2006; LEIBBRANDT, 2010; TALARICO et al., 2011) e ao HPV (papilomavirus humano) bloqueando a adsorção do vírus (BUCK et al., 2006). Estudos de

atividades antitumorais com carragenanas também apresentam resultados promissores *in vitro* e *in vivo* (ZHOU et al., 2004, 2006; FEDOROV et al., 2013; CALVO et al., 2019).

Em relação a atividade anticoagulante, as λ -carragenanas possuem a maior atividade (SILVA et al., 2010; SANTOS, 2015). O posicionamento dos grupos sulfato faz com que sua estrutura adote a conformação em fita, a qual é estabilizada por ligações de hidrogênio entre as hidroxilas ligadas ao C2 da unidade A com as do C3 da unidade B, diferentemente de κ - e ι -carragenanas que adotam conformação em hélice. A conformação ordenada de λ -carragenana pode ser um dos fatores que expliquem a atividade anticoagulante superior (MORRIS; REES; ROBINSON, 1980; CIANCIA; QUINTANA; CERESO, 2010). Dessa forma, a λ -carragenana se mostra como um promissor material de partida no desenvolvimento de análogos de heparina.

2.3 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

2.3.1 Coagulação sanguínea

O modelo clássico de cascata divide a coagulação em uma via extrínseca (via de contato, envolvendo elementos do sangue) e uma via intrínseca (via do fator tissular, iniciada por componentes presentes no espaço intravascular) que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X (FIGURA 2) (FRANCO et al., 2001; FERREIRA et al., 2010, CHEN; SEIFFERT; HAWES, 2014).

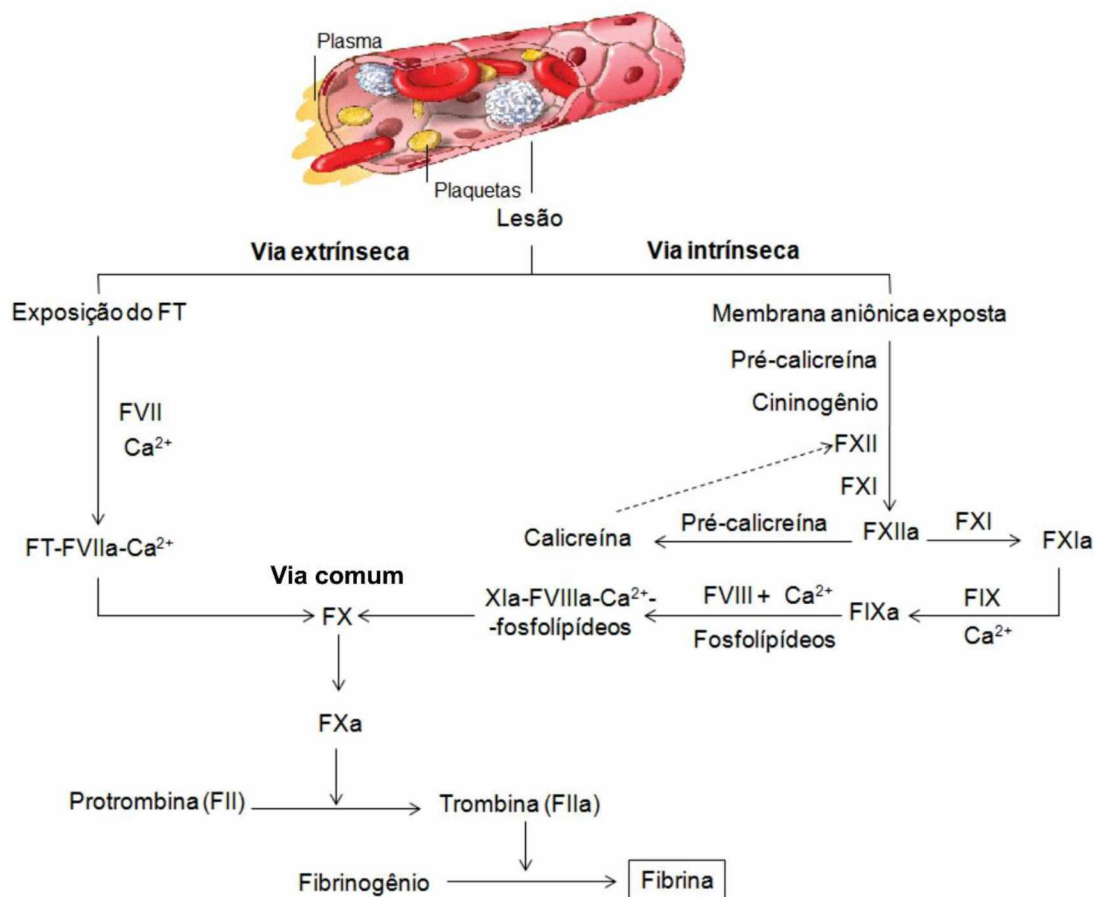
A via extrínseca é desencadeada pelo fator tissular (FT), também chamado de tromboplastina tecidual (Fator III). Este fator é expresso na camada endotelial dos vasos sanguíneos e é exposto após a lesão vascular. Por este fator não estar circulante no sangue esta via é chamada de extrínseca. Após a lesão e exposição do FT, este se liga ao fator VII que sofre uma autoclivagem em fator VIIa, na presença de cálcio. O complexo formado pelos FT-fator VIIa converte os fatores IX e X nas suas formas ativas (fatores IXa e Xa), na presença de íons cálcio (FRANCO, 2001; MURRAY et al., 2006; FERREIRA et al., 2010).

Na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando uma superfície que contém cargas elétricas negativas, expostas após a lesão, entram em contato com o sangue, em um processo denominado "ativação por contato". Esta via requer ainda

a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). Na presença de caliceína e cininogênio ativam o fator XII. O fator XII ativado ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado por traços de trombina, e em presença e íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X da coagulação (FRANCO et al., 2001; MURRAY et al., 2006; CARLOS; FREITAS, 2007; FERREIRA et al., 2010).

Na via final comum da cascata de coagulação, o fator Xa, proveniente da via intrínseca ou extrínseca, forma um complexo com o fator Va e com os fosfolípeos plaquetários ou teciduais. A formação deste complexo desencadeia a conversão da protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). Por fim, a trombina cliva o fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo (MURRAY et al., 2006; CARLOS; FREITAS, 2007).

FIGURA 2 - VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DO MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO



FONTE: O autor (2019).

Para manter a homeostasia, a coagulação sanguínea no organismo precisa ser rigorosamente regulada para que não ocorra excesso de formação de fibrina e conseqüentemente oclusão dos vasos. O sistema de anticoagulação é composto por enzimas que inibem a cascata em diferentes etapas. Dentre as proteínas anticoagulantes, destacam-se o inibidor do fator tecidual (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*), a antitrombina (AT) e o cofator II da heparina (HCII) (FRANCO et al., 2001; FERREIRA et al., 2010; REZENDE, 2010).

2.3.1.1 Avaliação laboratorial da coagulação *in vitro*

A via intrínseca pode também ser desencadeada *in vitro*, quando o sangue entra em contato com superfícies carregadas negativamente como o caulim, a sílica ou o vidro (FRANCO, 2001). Assim, as alterações de coagulação podem ser avaliadas utilizando métodos como o teste de aceitação universal tempo de tromboplastina parcial ativada (*activated partial thromboplastin time* - aPTT). O princípio do teste consiste na adição do reagente aPTT que contém um ativador plasmático (fornece uma superfície de carga altamente negativa para otimizar a ativação de contato dos fatores de coagulação) e fosfolípidos na amostra teste. O ativador plasmático é o responsável por desencadear o mecanismo de coagulação da via intrínseca através da ativação inicial do fator XII, na presença de íons cálcio (Ca^{2+}). Um dos métodos de detecção utiliza-se de medição ótica da formação de fios de fibrina insolúveis demonstrada pelo aparecimento de um coágulo, que se concentra no caminho da luz, ocasionando a mudança na transmissão de luz do detector (aumento de turbidez), fazendo com que o cronômetro pare indicando o tempo de coagulação (CURRY; PIERCE, 2007; LABTEST, 2010).

2.3.2 A heparina e a busca por heparino-miméticos a partir de polissacarídeos sulfatados

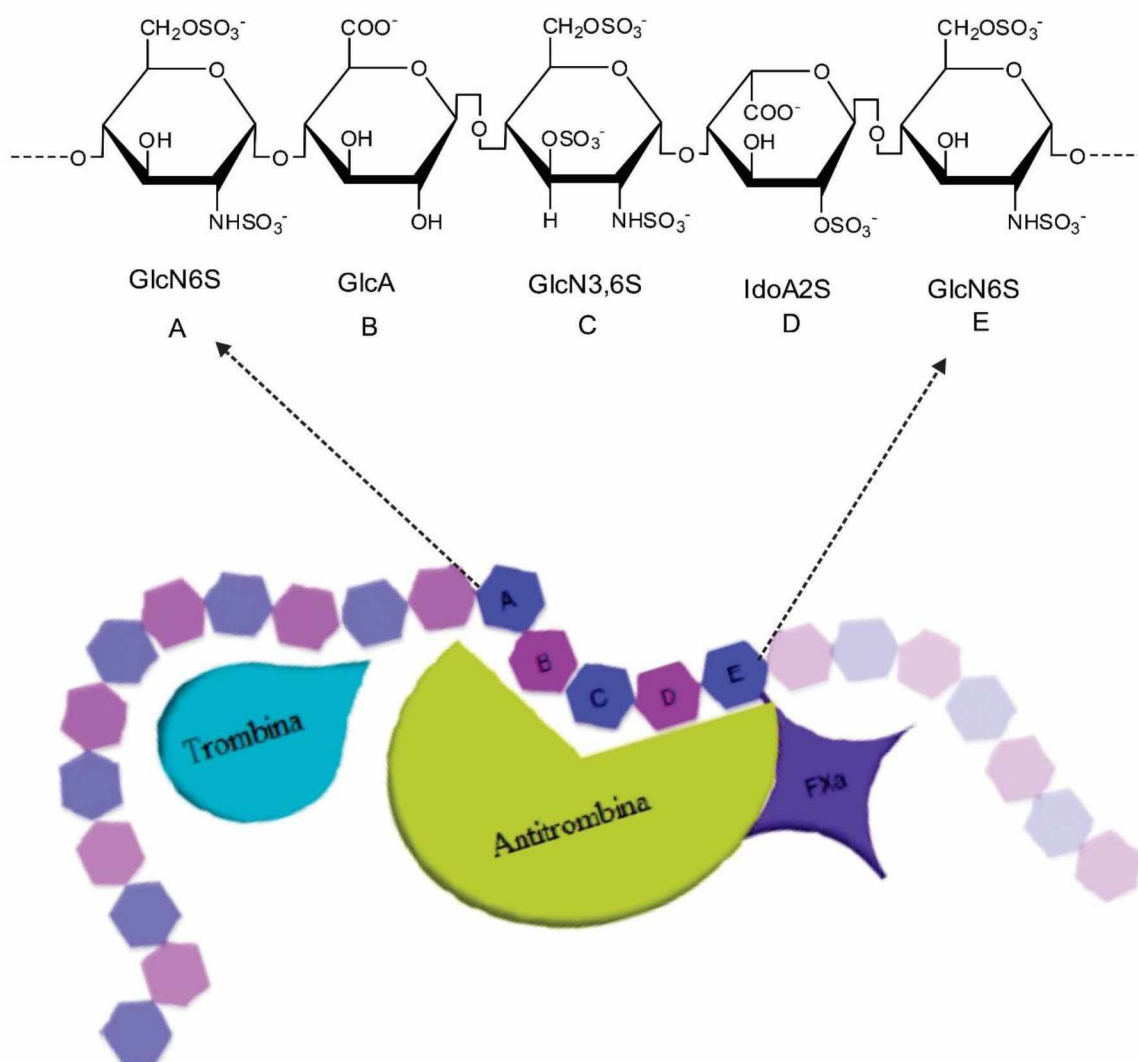
A heparina é um polissacarídeo da família dos glicosaminoglicanos, que incluem sulfato de condroitina, heparan sulfato, dermatan sulfato, queratan sulfato e ácido hialurônico (YATES; RUDD, 2016). No entanto, muitos dos medicamentos inibitórios da trombose são do tipo heparina, sendo essa o único polissacarídeo utilizado mundialmente como fármaco para o tratamento e profilaxia do

tromboembolismo venoso (OLSON et al., 2010; MULLOY et al., 2016). Assim, o uso de heparina concentra-se em processos cirúrgicos e hemodiálises, com o intuito de prevenir a formação de trombos (YATES; RUDD, 2016).

A heparina é obtida a partir de tecidos animais, principalmente da mucosa intestinal do porco (WALENGA; LYMAN, 2013). Sua massa molecular varia entre 3000 e 30000 g/mol (PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003), sendo classificadas em heparina de baixa massa molar (LMWH) e heparina não fracionada (UFH), respectivamente.

Os efeitos anticoagulante e antitrombótico da heparina são atribuídos à sua interação com a antitrombina (AT) através da sequência pentassacarídica da heparina (FIGURA 3).

FIGURA 3 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA DE LIGAÇÃO À ANTITROMBINA



FONTE: O autor (2019).

A interação proteína-polissacarídeo é altamente específica, induzindo a uma mudança na conformação da AT e aumentando cerca de 1000 vezes sua atividade inibitória sobre a trombina e o Fator X ativado (Xa), proteases da cascata de coagulação. A ativação de HCII ocorre na presença de altas concentrações de heparina (JIN et al., 1997; PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003; JOHNSON et al., 2006; OLSON et al., 2010; MULLOY et al., 2016).

A estrutura da heparina é heterogênea em termos de composição monossacarídica e padrão de sulfatação. Sua cadeia é linear, constituída por unidades alternadas de $\rightarrow 4$ -ácido urônico-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucosamina-(1 \rightarrow , onde o ácido urônico pode ser α -L-idurônico (IdoA) ou β -D-glucurônico (GlcA). O ácido idurônico pode estar sulfatado em C-2 (IdoA2S). A $\rightarrow 4$ - α -D-glucosamina-(1 \rightarrow (GlcN) pode ser sulfatada nos grupos amino, N-sulfatada (GlcNS), com ou sem sulfatação na posição 6-O-GlcNS6S. Além disso GlcNS e GlcNS6S podem ser 3-O-sulfatadas (GlcNS3S) e GlcNS3,6S (RABENSTEIN, 2002; CASU; NAGGI; TORRI, 2015).

Embora a heparina seja o fármaco anticoagulante mais utilizado, algumas complicações clínicas são relacionadas com o seu uso como sangramento e a trombocitopenia (ONISHI et al., 2016). Outros efeitos colaterais da heparina incluem as reações cutâneas como equimoses, necroses cutânea, urticárias, angioedema e eczema, os quais são produzidos pela administração subcutânea de LMWHs para o tratamento de tromboembolismo venoso pulmonar ou infarto de miocárdio (SCHINDEWOLF et al., 2012).

Outra limitação da heparina ocorre devido a sua procedência, que pode estar contaminada por patógenos (KONKLE et al., 2001). Dessa forma, as inúmeras desvantagens citadas impulsionam a busca por fontes complementares e mais seguras, tornando a descoberta de heparino-miméticos uma promissora área de pesquisa (AL NAHAIN et al., 2018).

Para desenvolver análogos de heparina a partir de polissacarídeos, duas principais estratégias tem sido utilizadas. A primeira abordagem promove a modificação química de polissacarídeos obtidos de diferentes fontes como plantas, fungos e animais (MATSUHIRO et al., 2014; ROMÁN et al., 2016; LI et al., 2017; DE CARVALHO et al., 2018), enquanto a segunda envolve o estudo de polissacarídeos naturalmente sulfatados obtidos principalmente de algas e invertebrados marinhos (ALVES et al., 2016; ARATA et al., 2016; YIN et al., 2018).

Como os polissacarídeos quimicamente e naturalmente sulfatados apresentam estruturas diferentes da heparina, o mecanismo de ação e conseqüentemente a interação com as proteínas na cascata de coagulação podem ser diferentes (GLAUSER et al., 2009; QUINDERÉ et al., 2014). Além disso, a identificação de estruturas específicas na cadeia polissacarídica sulfatada que poderiam ser correlacionadas com as propriedades anticoagulantes é uma importante tarefa no desenvolvimento de análogos de heparina (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010).

De maneira geral, a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados está relacionada com os parâmetros estruturais como composição monossacarídica, massa molar, grau de sulfatação, presença do grupo carboxílico, conteúdo de ácido urônico, conteúdo de grupos N-sulfato, O-sulfato e N-acetil (AGARWAL; DANISHEFKY, 1986; PAREDES-GAMERO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013; COSENZA et al., 2015; DE CARVALHO et al., 2018).

O padrão de sulfatação é reconhecido como um fator fundamental para a atividade anticoagulante de polissacarídeos (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010; POMIN, 2012; POMIN; MOURÃO, 2012; ARAÚJO et al., 2013). No trabalho realizado por Araújo e colaboradores (2013), foi investigada a influência da regioquímica do sulfato na atividade anticoagulante de derivados de carragenanas sintetizados por sulfatação química seletiva. O estudo mostrou que a posição dos grupos sulfato na cadeia polissacarídica pode ter uma maior influência sobre a atividade anticoagulante comparado com o grau de substituição para sulfato (DS), indicando que a substituição por sulfato em C6 da unidade β -D-Galp e C2 da unidade 3,6-anidro- α -D-Galp promovem um efeito benéfico na atividade anticoagulante.

A presença dos grupos carboxílicos também está relacionada com a atividade anticoagulante. Em relação a heparina, eles são importantes para a conformação espacial devido a flexibilidade do anel piranosídico na unidade de ácido idurônico, sendo importantes para a função anticoagulante da heparina (MULLOY; FORSTER, 2000; RUDD; YATES, 2010; PAREDES-GAMERO et al., 2012).

No trabalho de Agarwal e Danishefsky (1986), a carboxila dos ácidos urônicos da heparina foi convertida em grupos metil éster. Após esta modificação, foi observada a perda da atividade anticoagulante, mostrando que a presença de

grupos carboxílicos é essencial para a atividade anticoagulante da heparina. Contudo, Paredes-Gamero e colaboradores (2012) observaram que a atividade anticoagulante da heparina dessulfatada foi menor que a da heparina carboxi-reduzida, sugerindo que para a heparina, grupos sulfato são mais importantes do que grupos carboxílicos.

Dessa forma, a oxidação e a sulfatação se mostram como modificações que podem potencializar a atividade anticoagulante em polissacarídeos.

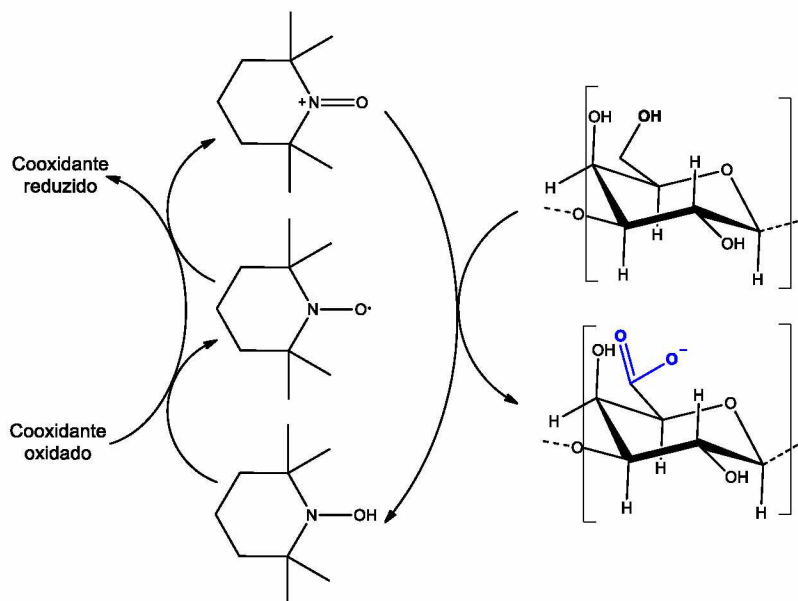
2.4 OXIDAÇÕES EM CARRAGENANAS

A oxidação de polissacarídeos pode aumentar as propriedades de superfície do polímero e promover a absorção de proteínas por favorecer a ligação, proliferação e diferenciação celular (SU et al., 2013). Os materiais oxidados podem ser usados na terapia regenerativa (FORGET et al., 2013) para a fixação de tecidos biológicos com boa biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (LI et al., 2016). Além disso, podem apresentar diferentes atividades biológicas, como a atividade antibacteriana (SONG et al., 2010; JAYAKUMAR et al., 2010) e antiviral (COSENZA et al., 2015).

Iota- e *lambda*-carragenanas, por exemplo, já foram oxidadas com íon permanganato e, κ -carragenana com solução aquosa de perclorato em cerium (IV), gerando derivados cetoácidos (HASSAN et al., 2010, 2011). Quando utilizado peróxido de hidrogênio-Cu(II) como oxidantes (ZHU et al., 2017), foi produzido uma baixa oxidação, em torno de 4-7%, de ácidos urônicos e 0,8-1,2 % de aldeídos.

No entanto, um método efetivo e regioseletivo de introduzir o grupo carboxílico em polissacarídeos é a oxidação C6 seletiva (FIGURA 4), pois oxida as hidroxilas primárias na presença das hidroxilas secundárias. Essa reação é realizada utilizando o reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995) e em geral, apresenta alta taxa de reação, ocorrendo em uma única etapa sem necessidade de precauções como atmosfera inerte ou solvente anidro.

FIGURA 4 - REAÇÃO GERAL DA OXIDAÇÃO DE ÁLCOOIS PRIMÁRIOS EM POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO.



FONTE: O autor (2019).

Dentre as vantagens da utilização do reagente TEMPO, destaca-se sua propriedade óxido-redutora, que permite sua regeneração *in situ* por um cooxidante, sendo por isso adicionado em quantidades catalíticas (em torno de 1% do substrato) (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995; LUCA et al. 2003; PEREZ, MONTANARI, VIGNON, 2003; BRAGD et al., 2004).

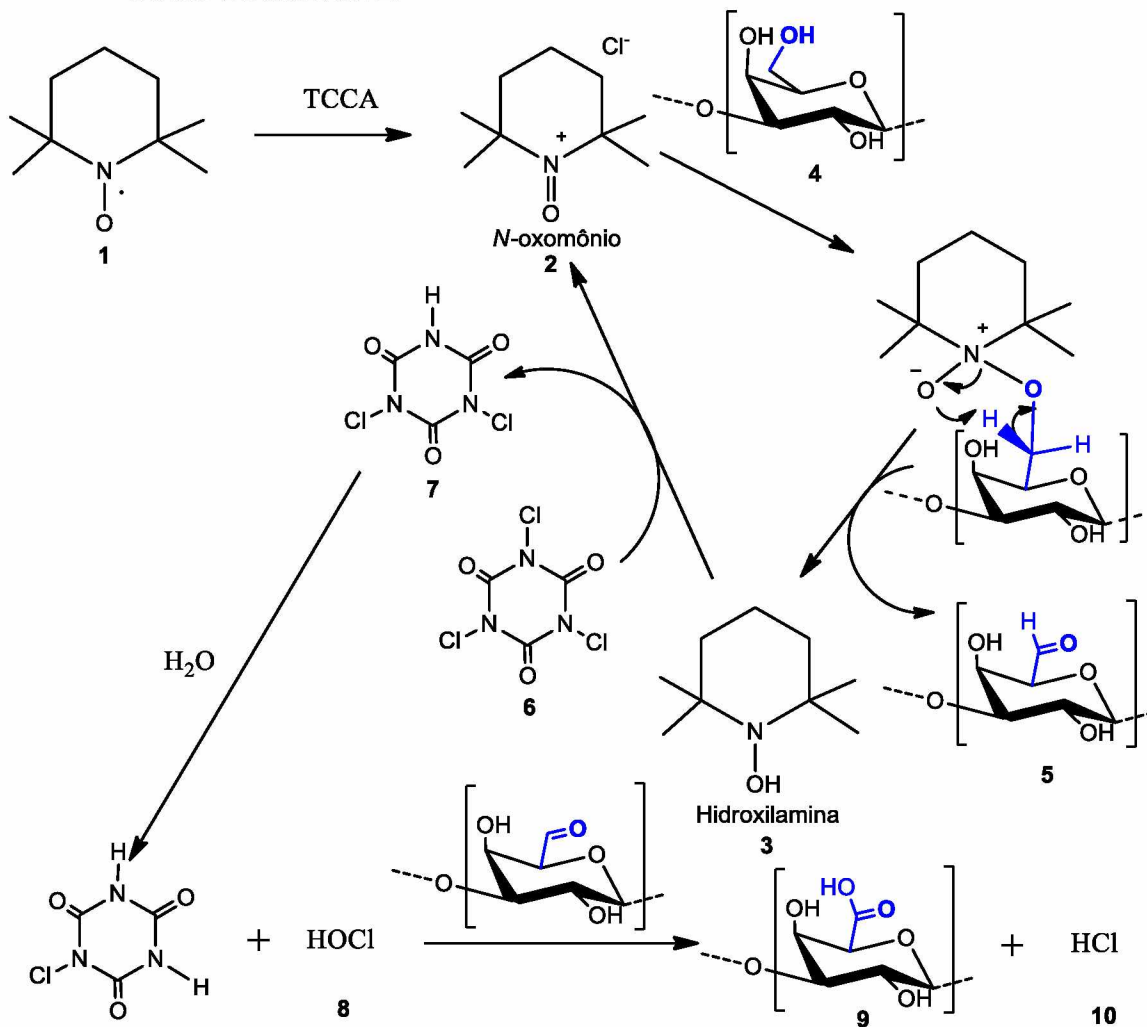
Na literatura são utilizados diferentes cooxidantes para regeneração do reagente TEMPO como ácidos trihaloisocianúricos, O_2-Cu , hipoclorito de sódio (NaClO), clorito de sódio, (NaClO₂), bromito de sódio, (NaBrO), Cu(NO₃)₂, peróxido em presença de prata, entre outros (PONEDEL’KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010), mas o sistema NaOCl–NaBr é o mais comum para a oxidação de polissacarídeos.

O ácido tricloroisocianúrico (TCCA), pertencente ao grupo dos ácidos trihaloisocianúricos, é um composto conhecido já há muito pela indústria devido as suas características como fácil manipulação, baixo custo e estabilidade, sendo facilmente encontrado em um grande número de produtos comerciais (CHATTAWAY; WADMORE, 1989). Como cooxidante, o TCCA catalisa a reação de maneira branda, simples e homogênea (TILSTAM; WEINMANN, 2002; WENGERT; SANSEVERINO; MATTOS, 2002), produzindo ácido hipocloroso após decomposição em água (BASU et al., 2013; MENDONÇA; MATTOS, 2013).

Dessa forma, a união desses dois reagentes (TEMPO e TCCA) permite a oxidação de álcoois primários para aldeídos e ácidos carboxílicos sobre condições reacionais suaves e com alto grau de quimioseletividade (LUCA et al. 2003).

Na FIGURA 5 é apresentado o mecanismo de reação entre os dois reagentes. onde uma quantidade catalítica de cooxidante TCCA (6) pode reagir com o reagente TEMPO (1) para formar o íon oxoamônio (2) que reage com o álcool (4) originando o composto carbonil (5). A hidroxilamina (3) é reoxidada pelo TCCA (6) ao íon oxoamônio (2). A hidrólise do TCCA (6) e seu derivado (7) podem formar o ácido hipocloroso (8) capaz de oxidar o aldeído (5) até o ácido carboxílico (9). Ainda a reação entre os ácidos clorídrico (10) e hipocloroso (9), formados durante o processo, podem originar clorinas capazes de clorinar os compostos carbonílicos, formando dessa forma subprodutos na reação (SANDERCOCK; BARNETT, 2009).

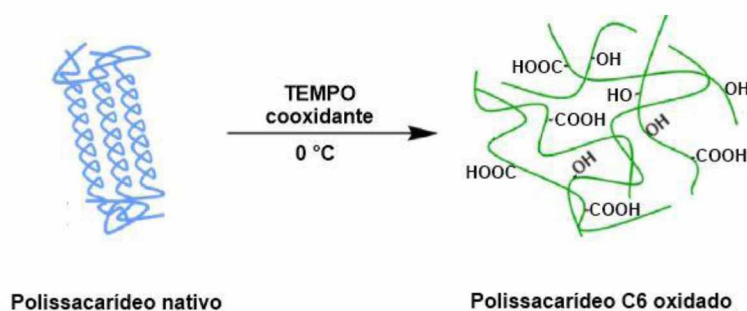
FIGURA 5 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO SELETIVA DE UM ÁLCOOL PRIMÁRIO UTILIZANDO TCCA COMO COOXIDANTE.



FONTE: Adaptado de Luca et al. (2003).

Forget e colaboradores (2013) realizaram a oxidação seletiva de κ -carragenana e agarose utilizando TEMPO e NaOCl–NaBr como cooxidante. De acordo com os autores, a carboxilação promove a separação das cadeias polissacarídicas devido a repulsão eletrostática, gerando uma tensão na estrutura, diminuindo as ligações de hidrogênio e promovendo a reorganização da cadeia, onde essa passa de α -hélice para folha- β (FIGURA 6). Esse trabalho esclarece a estrutura de κ -carragenana após a inserção da carboxila em C6, onde foi observado a coexistência de duas estruturas secundárias, α -hélice e folha- β .

FIGURA 6 - ESQUEMA DA MUDANÇA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL APÓS A OXIDAÇÃO SELETIVA



FONTE: O autor (2019).

K-carragenana obtida a partir de *Hypnea musciformis* e uma i-carragenana comercial foram oxidadas com TEMPO na presença de NaOCl–NaBr (COSENZA et al., 2015) em diferentes graus de oxidação. O controle do pH foi realizado utilizando NaOH ou tampão bicarbonato. Neste trabalho, os autores observaram a oxidação da unidade β -D-Galp em β -D-GalAp para as duas carragenanas. Entretanto, a κ -carragenana apresentou uma reação secundária, onde ocorreu uma específica oxidação em C2 da unidade 3,6-anidrogactose. A oxidação de hidroxilas secundárias em carboidratos foi apontada como uma reação lateral, já observada em outros trabalhos utilizando o reagente TEMPO (NOOY; BESEMER; VAN BEKKUM, 1995; SU et al., 2013). De acordo com Cosenza e colaboradores (2015), quando é adicionado o agente redutor NaBH_4 a oxidação em C2 da unidade 3,6-anidrogactose não é observada, pois a oxidação de um carbono secundário gera uma cetona, que após a redução com o NaBH_4 forma-se um álcool secundário.

No trabalho de SANTOS (2015), as carragenanas *kappa*-, *iota*-, *theta*-, *lambda*- e o híbrido *iota/nu*, possuindo diferentes padrões de sulfatação, foram oxidadas em diferentes graus de oxidação utilizando o sistema TEMPO-TCCA em

solução aquosa tamponada em tampão bicarbonato. Além disso, foi realizado um estudo de otimização da reação de oxidação seletiva utilizando a κ-carragenana como substrato que mostrou que conforme o aumento do TCCA, independentemente do tempo de reação, aumenta-se o grau de oxidação.

2.5 REOLOGIA APLICADA AOS SISTEMAS CONTENDO CARRAGENANAS

As propriedades físicas e químicas de soluções, géis e de misturas de polissacarídeos contendo carragenanas são extremamente diversificadas. Assim, na literatura são abordadas diversas técnicas para avaliar o comportamento de formulações contendo tais polissacarídeos como espalhamento de luz estática, dispersão rotatória ótica (MANGIONE et al., 2005), análise microestrutural, análise de perfil de textura (THRIMAWITHANA et al., 2010; WANG et al., 2018), microscopia confocal (BUI et al., 2019a), microcalorimetria e calorimetria diferencial de varredura (EVAGELIOU; RYAN; MORRIS, 2019), rastreamento de partículas (GEONZON; BACABAC; MATSUKAWA, 2019), dicroísmo circular, espalhamento de luz dinâmico e, potencial zeta (FORGET et al. 2013), entre outros.

Análises reológicas podem ser utilizadas como uma ferramenta para o controle de qualidade, desenvolvimento de produtos e investigação da liberação de substâncias ativas (LIPPACHER; MULLER; MADER, 2004), sendo uma técnica primordial para ampliar e aprimorar suas aplicações.

Reologia é a ciência da deformação e do fluxo da matéria, e estuda a maneira como os materiais respondem às deformações ou tensões aplicadas, descrevendo e medindo estas respostas. Um dos objetivos da reologia consiste em estabelecer a relação entre as propriedades reológicas do material e sua composição macromolecular (MALKIN, 1994).

Nas análises oscilatórias dinâmicas as amostras são submetidas à variação de aplicação de uma tensão, que varia com o tempo de forma senoidal, produzindo uma deformação. A diferença de fase entre as oscilações da tensão e da deformação caracteriza o ângulo de fase δ . Em um fluido viscoso ideal a tensão e a deformação estão completamente fora de fase e $\delta = 90^\circ$. Em um sólido elástico perfeito a tensão e a deformação estão em fase e $\delta = 0^\circ$. Nos materiais viscoelásticos $0^\circ < \delta < 90^\circ$, desta forma quando $0^\circ < \delta < 45^\circ$ o material se comporta

como um sólido viscoelástico, quando $45^\circ < \delta < 90^\circ$ é caracterizado um fluido viscoelástico (MALKIN, 1994).

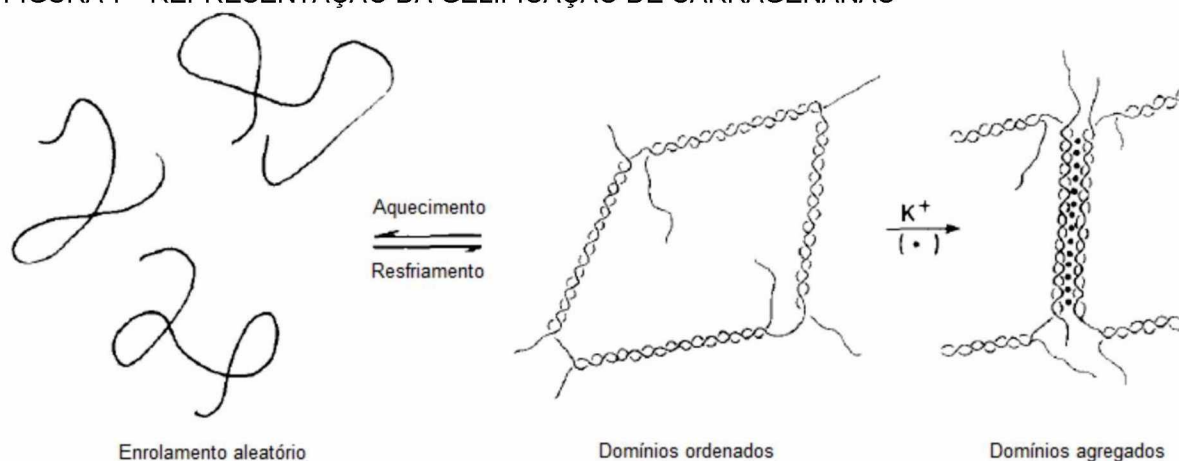
Os resultados obtidos são muito sensíveis à composição química. De acordo com Lippacher, Muller e Mader (2004), a mudança do ângulo de fase da região elástica ($\delta < 45^\circ$) para a região viscosa ($\delta > 45^\circ$), pode indicar a destruição da estrutura interna do sistema. Assim, um material mais estável irá apresentar uma região viscoelástica linear mais ampla do que um com uma estrutura fraca e sensível.

O termo G' é a componente da tensão que está em fase com a deformação. É denominado de módulo de armazenamento ou elástico e permite a determinação da energia elástica armazenada. O termo G'' é o componente da tensão que está 90° fora de fase com a deformação, chamado de módulo de perda ou viscoso, que permite determinar a energia perdida pelo fluxo viscoso. Estes entre outros parâmetros, como o módulo complexo (G^*), são utilizados para a análise da viscoelasticidade de sistemas complexos (LIPPACHER; MULLER; MADER, 2004).

A respeito das propriedades reológicas de carragenanas, κ - e ι - podem formar géis como uma função da temperatura e dos cátions, como lítio (Li^+), sódio (Na^+), cobre (Cu^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), amônio (NH_4^+) e potássio (K^+), chamados agentes indutores de gel. Assim, em baixas temperaturas (até 35°C), as cadeias em estado de enrolamento aleatório formam duplas hélices entre as regiões repetitivas das díades β -D-Galp-4-sulfato e 3,6-anidro- α -D-Galp da κ -carragenana e β -D-Galp-4-sulfato e 3,6-anidro- α -D-Galp-2-sulfato da ι -carragenana. Essa mudança é conhecida como de transição emaranhado ao acaso para conformação em dupla hélice (HOFFMANN; RUSSELL; GIDLEY, 1995)

Na presença dos cátions mencionados, principalmente do K^+ , as carragenanas se agregam e se organizam de maneira ordenada devido a interação dos cátions com os grupos sulfatos. A formação de rede se dá através do aprimoramento do ordenamento conformacional e da agregação subsequente (MORRIS; REES; ROBINSON, 1980; ROCHAS; RINALDO, 1984; KARA et al., 2003; WANG et al., 2018) (FIGURA 7).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA GELIFICAÇÃO DE CARRAGENANAS



FONTE: O autor (2019).

Além do cátion, sua concentração e fatores como a concentração polissacarídica influenciam na gelificação das carragenanas. Em relação a concentração de cátions, mesmo quantidades traço de outra espécie catiônica podem induzir mudanças nas propriedades reológicas dessas preparações, como o aumento de G' (CHEN; LIAO; DUNSTAN, 2002; WANG et al., 2018).

Nesse contexto, Robal e colaboradores (2017) realizaram a troca catiônica em κ - e ι -carragenanas comerciais para a forma H^+ e depois converteram-nas na forma de outras sais com o objetivo de avaliar as propriedades físico-químicas das preparações catiônicas puras. Com isso, foi observado que as propriedades reológicas das preparações puras diferem das comerciais. A forma pura de κ -carragenana com K^+ apresenta moderada habilidade gelificante, porém, quando na presença de Ca^{2+} por exemplo, tem um G' aumentado em 20 vezes.

Usualmente, na indústria alimentícia são usadas as carragenanas comerciais que levam uma mistura de cátions em quantidades traço variadas. Nos ensaios reológicos relatados na literatura são utilizadas tanto carragenanas comerciais quanto as extraídas, ambas com diferentes procedimentos de preparação e purificação, o que dificulta a comparação dos resultados com outros autores.

Em geral, as concentrações de cátions utilizadas nas preparações de κ -carragenana são baixas, até a concentração de 0,1 mol/L. Nessa concentração, o efeito dos cátions na força do gel de κ -carragenana segue a ordem $Li^+ < Na^+ < Cu^{2+} < Mg^{2+} < Ca^{2+} < NH_4^+ < K^+$ (WANG et al., 2018).

Nesse trabalho foi investigado se o grupo carboxila teria o mesmo efeito que o grupo sulfato, de interagir com o K^+ e favorecer a gelificação. Assim, de forma inédita foi avaliado o efeito da oxidação seletiva C6 nas propriedades viscoelásticas de κ -carragenana em comparação com a κ -carragenana nativa.

2.6 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE CARRAGENANAS

Apesar das atividades biológicas já discutidas para as carragenanas, a alta massa molar e a alta viscosidade limitam parte de seu potencial terapêutico (KALITNIK et al., 2013). Como a regioquímica dos grupos sulfatos e o tamanho da cadeia polissacarídica estão diretamente ligados à sua atividade biológica, uma maneira de ultrapassar este inconveniente é degradar as carragenanas em derivados com menor massa molar, produzindo assim oligossacarídeos (GHANBARZADEH; GOLMORADIZADEH; HOMAEI, 2018).

Aos oligossacarídeos de κ -carragenana atribuem-se atividades antivirais (WANG et al., 2012); anticoagulantes (GROULT et al., 2019) e antibacterianas (WANG et al., 2012). Ainda, apresentam atividade estímulo-defesora para as células vegetais, sendo potencialmente úteis como compostos bioativos na agricultura (POTIN et al., 1999; SHUKLA et al., 2016).

Recentemente, foi relatado que κ -, λ -carragenana e seus derivados oligossacarídeos apresentaram efeito citotóxico contra células tumorais LM2. Dentre esses, κ -carrabiose foi a mais ativa. Os autores sugerem que os derivados de carragenanas com as menores massas molares apresentaram-se mais citotóxicos do que os polissacarídeos precursores (CALVO et al., 2019).

A despolimerização de carragenanas pode ser alcançada por diversas formas, como irradiação de raios gama (ABAD et al. 2009, 2010), ultrassom (LII et al. 1999), hidrólise ácida (YU et al., 2002; DUCATTI et al., 2011; CALVO et al., 2019; FIGUEIREDO et al., 2019) ou hidrólise enzimática (KNUTSEN;GRASDALEN, 1992; SUN et al., 2014). O método como os oligossacarídeos são obtidos afeta o grau de despolimerização, a massa molecular, o conteúdo de sulfato e de açúcares redutores, e, portanto tem um papel importante na bioatividade (WANG et al., 2012; SUN et al., 2015).

Levando isso em consideração, as hidrólises enzimáticas e ácidas são metodologias que podem preservar os grupos sulfato (KNUTSEN; GRASDALEN,

1992; GONÇALVES, 2005). Assim, são métodos tradicionais para obtenção de oligossacarídeos visando aplicações biológicas, visto que, vários estudos com polissacarídeos sulfatados mostram que a bioatividade desses biopolímeros dependem do número e distribuição de grupos sulfato ao longo da cadeia polissacarídica (ARAÚJO et al., 2013).

No entanto, a hidrólise enzimática utiliza enzimas chamadas carragenases para a hidrólise das ligações internas β -(1-4) que são produzidas apenas por espécies marinhas bacterianas, o que eleva o custo reacional (KNUTSEN; GRASDALEN, 1992; GHANBARZADEH; GOLMORADIZADEH; HOMAEI, 2018).

A hidrólise ácida parcial, por sua vez, promove a quebra da ligação 3,6-anidro- α -glicosídica gerando oligossacarídeos com número par de unidades, contendo no terminal redutor a unidade anidrogalactosídica com C1 na forma de um diol geminal (aldeído hidratado) (DUCATTI et al., 2011). Em condições drásticas, por exemplo, alta concentração de ácido, ácidos fortes como o HCl e aumento de temperatura, os terminais 3,6-anidrogalactose são degradados e são gerados oligossacarídeos com número ímpar de unidades (YU et al., 2002).

Quando a hidrólise ácida parcial é realizada na presença de um agente redutor estável em meio ácido, o 4-metilmorfolina borano, ela é chamada de hidrólise redutiva parcial (USOV; ELASHVILI, 1991) e ao final da reação são obtidos oligossacarídeos na forma de alditóis. A nomenclatura é realizada de acordo com o número de unidades e acrescentando-se o sufixo itol caso seja um oligossacarídeo alditol, ou ose, para oligossacarídeos na forma de aldeídos hidratados. Assim, por exemplo, um dissacarídeo alditol derivado de κ -carragenana, recebe o nome de carrabiitol 4² – sulfato, e caso seja um dissacarídeo com terminal hidratado, carrabiose 4² – sulfato (USOV; ELASHVILI, 1991, 1997).

No trabalho de Gonçalves e colaboradores (2005), a hidrólise redutiva parcial foi utilizada para produzir oligossacarídeos alditóis a partir de quatro tipos de galactanas sulfatadas: κ -carragenana (*Kappaphycus alvarezii*), θ -carragenana (*Gigartina skottsbergii*), agarose 6-sulfato (*Gracilaria domingensis*), e agarana 2-sulfato piruvilada (*Acanthophora spicifera*). A hidrólise da κ -carragenana com TFA 0,5 mol/L na presença do complexo 4-metilmorfolina borano (4-MMB) a 60 °C, após a purificação utilizando cromatografias de troca aniônica e gel permeação, produziu o dissacarídeo carrabiitol 4²-sulfato e o tetrassacarídeo carratetraitol 4²,4⁴-dissulfato.

Agarose e κ -carragenana foram submetidas a hidrólise ácida parcial com TFA 0,1 M, 65 °C para produzir oligossacarídeos contendo unidades de 3,6-anidro-galactose na forma de aldeído hidratado. A partir da κ -carragenana foi produzidas *kappa*-carrabiose e *kappa*-carratetraose purificadas por cromatografia de gel permeação (DUCATTI et al., 2011).

Novas metodologias de obtenção e avaliação do processo hidrolítico tem sido desenvolvidas. Figueiredo e colaboradores (2019) seguiram a mesma metodologia utilizada por Ducatti et al. (2011), no entanto converteram os oligossacarídeos para sua forma alditol em uma etapa posterior utilizando NaBH₄. Para a purificação, foi utilizada a cromatografia de troca iônica utilizando DEAE – Sephacel gerando os oligossacarídeos *kappa*-carrabitol 4²-sulfato; *kappa*-carratetraitol 4², 4⁴-dissulfato e *kappa*-carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato. Os produtos purificados foram utilizados como padrões no desenvolvimento e validação de um método de separação utilizando eletroforese capilar.

O método desenvolvido permitiu quantificar e avaliar a produção e o tipo de oligossacarídeo em função do tempo de hidrólise pelas duas metodologias: hidrólise redutiva parcial e hidrólise ácida parcial, onde foi possível relacionar a concentração oligossacarídica com as áreas dos picos presentes nos eletroferogramas, a fim de se determinar condições ideais para obtenção de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização. O estudo mostrou que a hidrólise ácida parcial apresenta vantagens na geração de oligossacarídeos em maior quantidade, especialmente o dissacarídeo, além de apresentar menor consumo e custo de reagentes.

Até onde se tem conhecimento, ainda não foi reportada na literatura a produção e caracterização estrutural de carragenanas oxidadas com baixa massa molar. Dessa forma, a hidrólise ácida parcial com posterior redução para alditóis se mostra uma metodologia eficiente para a produção de oligossacarídeos oxidados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES κ N, ι/ν N, λ N, ι N E θ N

As amostras de κ -carragenana (κ N) extraída da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (ARAÚJO et al.; 2013; DUCATTI et al., 2011), do híbrido *iota/nu*-carragenana (ι/ν N) extraído da espécie *Eucheuma denticulatum* (ARAÚJO et al., 2013) e de *lambda*- (λ N)-carragenana extraída da espécie *Gigartina skottsbergii* (fase tetraspórica) (GONÇALVES et al., 2005) já estavam disponíveis no laboratório. *Iota*- (ι N) e *theta*-carragenanas (θ N) foram obtidas a partir do tratamento alcalino (CIANCIA et al., 1993; VIANA et al., 2004) de ι/ν N e λ N, conforme descrito em Santos (2015).

3.2 ORIGEM E OBTENÇÃO DA FRAÇÃO K

A alga *Kappaphycus alvarezii* foi adquirida seca da empresa MM algas (Praia Grande, Angra dos Reis - RJ). Inicialmente, a alga foi lavada com água corrente e seca a temperatura de 60 °C por 24 h. Em seguida, foi processada em moinho de facas, e 40 g da alga moída foi submetida à extração aquosa à 70 °C por 5 h como descrito por Gonçalves et al. (2005). O extrato obtido foi centrifugado (8000 rpm por 20 minutos) e ao sobrenadante foi adicionado 3 volumes de etanol. Após centrifugação, os polissacarídeos precipitados foram separados do sobrenadante etanólico, ressolubilizados em água destilada e dialisados contra uma solução de NaCl 0,2 mol/L durante 24 h. Em seguida, dialisados contra água destilada e liofilizados.

3.3 REDUÇÃO DA FRAÇÃO K E OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KR.

A fração K (κ -carragenana) (16,3 g) foi reduzida com 2,45 g de NaBH₄ de acordo com a metodologia de Araújo et al. (2013) para redução dos terminais redutores dos polissacarídeos (ASPINALL, 1982). Para isso, o polissacarídeo foi solubilizado em água destilada na concentração de 0,01 g/mL. Após a completa dissolução, foi adicionado 15 % (m/m) de NaBH₄. A solução foi agitada durante 4h. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 5 com adição de CH₃COOH

concentrado e a mistura foi concentrada em rotaevaporador. O material foi dialisado em membrana de 14 KDa contra água destilada e liofilizado, apresentando 84% de rendimento para a fração KR.

3.4 OXIDAÇÃO SELETIVA DE CARRAGENANAS

As carragenanas nativas κ N, λ N, ι N, θ N e ι/ν N (0,73 mmol) e 0,15 mmol do reagente TEMPO foram solubilizados em 40 mL de água deionizada e resfriados a 0 °C em um banho de gelo. Paralelamente, TCCA (2,21 mmol) foi solubilizado em 260 mL de tampão bicarbonato 0,1 mol L⁻¹, pH 9,6, resfriado previamente a 0 °C e adicionado a solução polissacarídica. As soluções foram agitadas durante 2 h. Em seguida, foi adicionado etanol (3× a quantidade de TCCA) e 7,3 mmol de NaBH₄ e agitou-se por 1 h. As soluções resultantes foram neutralizadas com ácido acético concentrado, dialisadas contra água destilada em membrana de 14 KDa e liofilizadas. Os produtos obtidos de κ N, λ N e θ N foram κ OT, λ OP e θ OP, respectivamente. As amostras ι/ν OT, ι OT, λ OT e θ OT foram obtidas como descrito para obtenção de κ OT, λ OP e θ OP, exceto que as soluções foram agitadas por 15 h. Para a preparação de κ OP, a reação foi realizada utilizando 0,73 mmol de TCCA (1 equiv.) e agitando-se por 2 h. A FIGURA 8 apresenta um fluxograma da obtenção das frações.

FIGURA 8 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES κ N, ι/ν N, λ N, ι N, θ N E SEUS DERIVADOS OXIDADOS.

(continua)

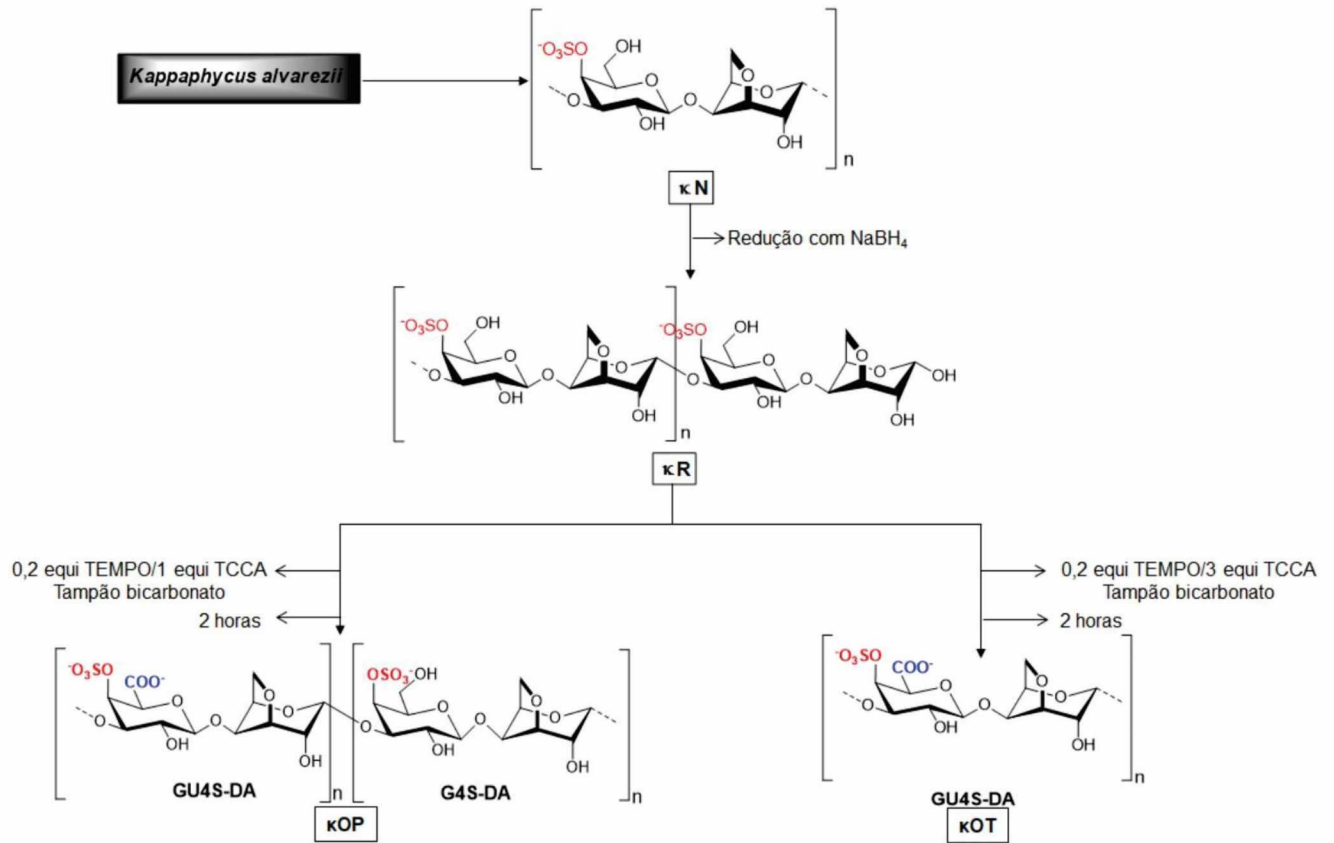


FIGURA 8 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES κN, ι/νN, λN, ιN, θN E SEUS DERIVADOS OXIDADOS.

(continua)

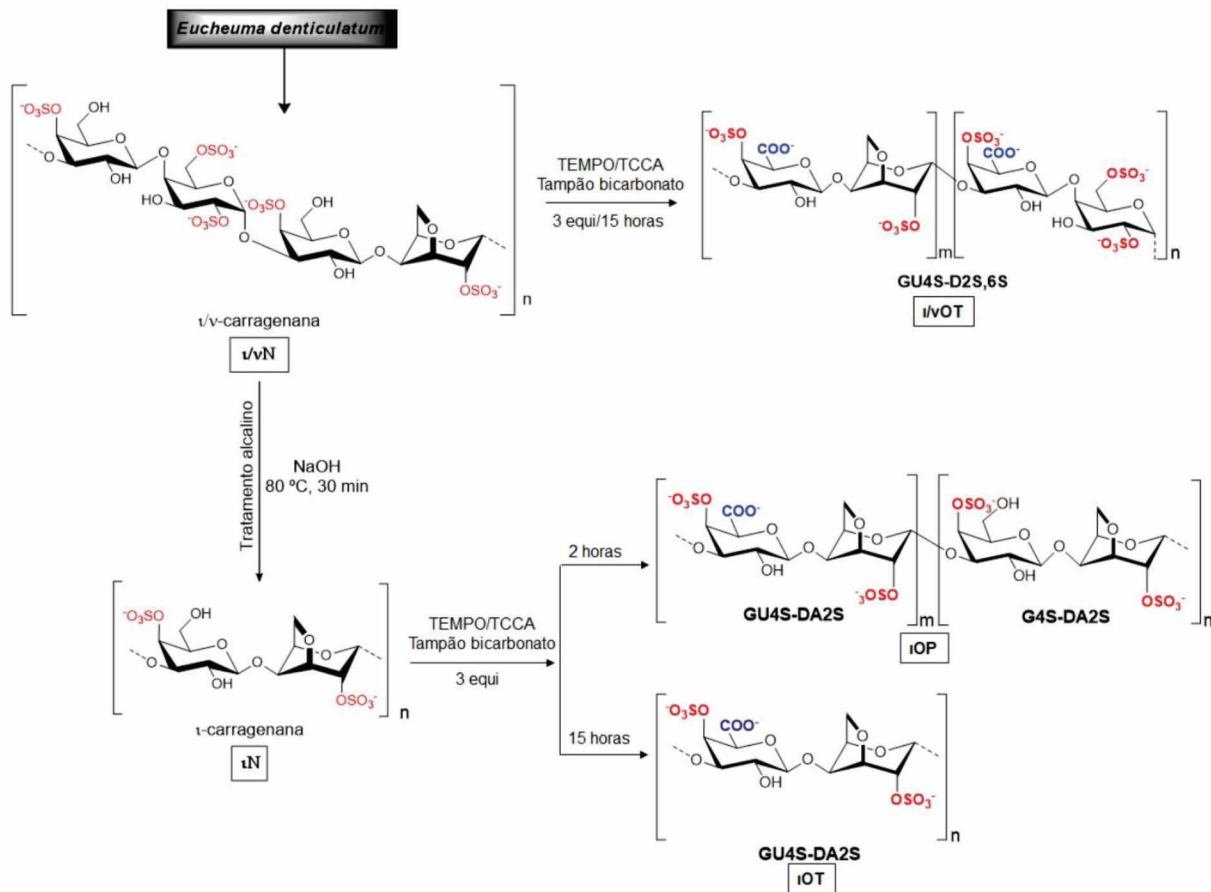
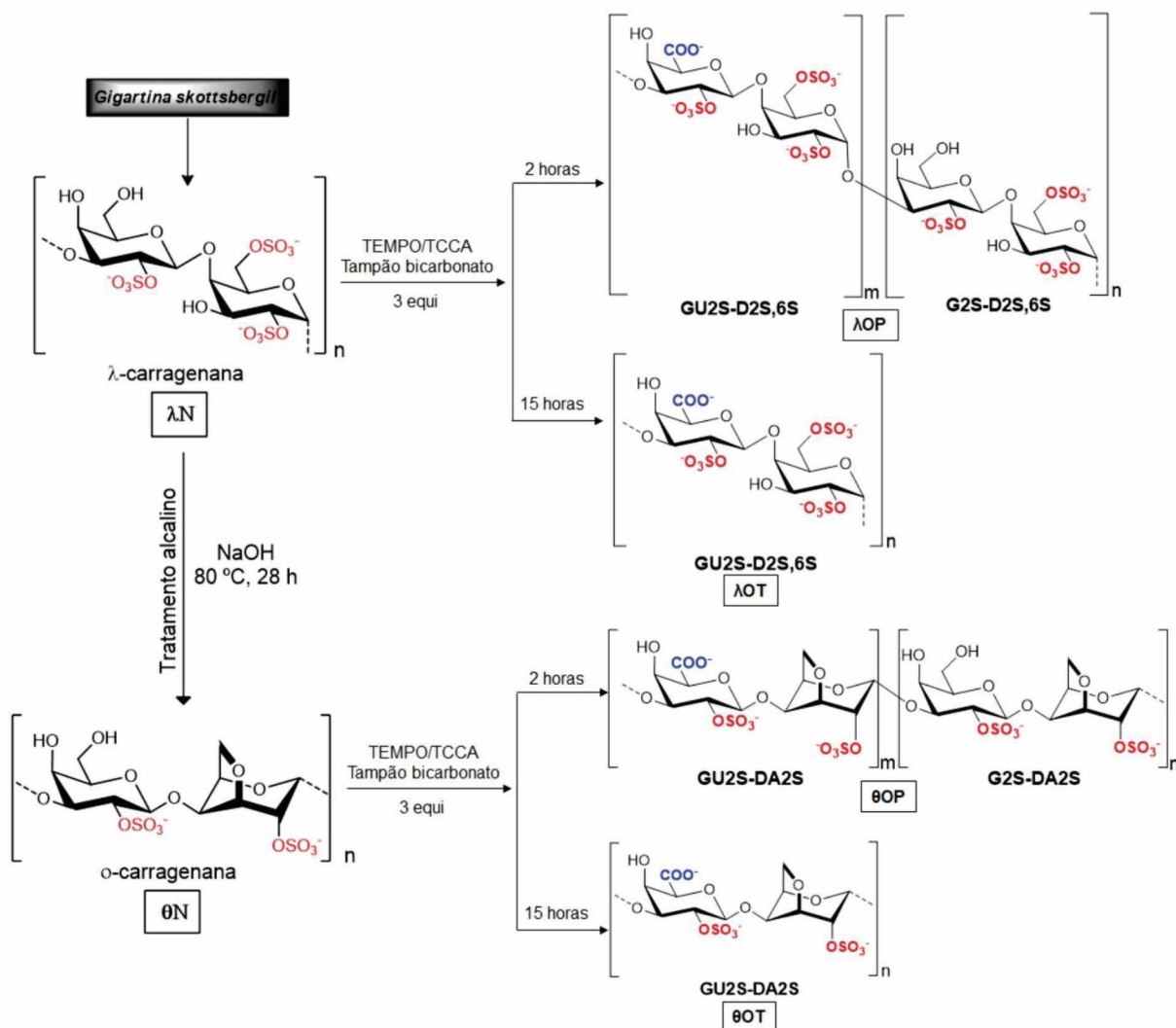


FIGURA 8 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES κN, ιVN, λN, IN, θN E SEUS DERIVADOS OXIDADOS.

(conclusão)



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: As estruturas representam as díades sintetizadas.

A amostra KR (8 g) foi C6 oxidada pela mesma metodologia utilizada para obtenção de κOP por 15 h resultando em KOx e por 6 h utilizando tampão bicarbonato 0,2 mol/L e diálise em membrana de 3,5 KDa gerando KO.

Para determinação do grau de oxidação (DOx) foi utilizado RMN de ¹H. A Equação 1 foi utilizada para quantificar o DOx dos derivados oxidados obtidos de κ- e ι-carragenanas.

$$DOx = 100 \% - \left[\frac{\left(\frac{G_{5,6}}{G_2} \right)_{Oxidado}}{\left(\frac{G_{5,6}}{G_2} \right)_{Nativo}} \times 100 \% \right] \quad (1)$$

onde:

G5,6 = representa a área de integração correspondente aos sinais de H6 e H5 (3,79 ppm) das unidades β -D-galactopiranosose 4-sulfato (local da modificação). Com a oxidação do polissacarídeo, estes sinais devem desaparecer ou diminuir de acordo com o grau de oxidação alcançado;

G2 = representa a área de integração do sinal correspondente ao H2 (3,59 ppm) das unidades β -D-galactopiranosose 4-sulfato. Este sinal foi escolhido pois corresponde somente a um hidrogênio e se mantém com pouco deslocamento tanto na fração nativa quanto na oxidada, servindo para estabelecer uma relação com a área integrada em 3,79 ppm.

A equação 2 foi utilizada para os derivados oxidados de λ - e θ -carragenanas.

$$DOx = 100 \% - \left[\frac{\left(\frac{G_{5,6}}{H1_{Oxidado}} \right)}{\left(\frac{G_{5,6}}{H1_{Nativo}} \right)} \times 100 \% \right] \quad (2)$$

onde:

G5,6 = representa a área de integração correspondente aos sinais de H6 e H5 (3,68 e 3,82 ppm) das unidades β -D-galactopiranosose 2-sulfato (local da modificação);

H1 = representa a área de integração correspondente ao sinal de H1 das unidades α -D-galactopiranosose-2,6-dissulfato (5,55 ppm para λ -carragenana) ou 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (5,28 ppm para θ -carragenana). Como neste caso o H2 da unidade B se encontra sobreposto, o H1 foi escolhido pois corresponde somente a um hidrogênio e se mantém sem deslocamento tanto na fração nativa quanto na oxidada de ambas carragenanas, servindo para estabelecer uma relação com a área integrada correspondente a H6 e H5 de G2S.

3.5 ANÁLISES REOLÓGICAS DINÂMICO OSCILATÓRIAS

As medidas reológicas foram realizadas em reomêtro Haake Mars (Thermo Electron GmbH, Alemanha) acoplado a um banho termoestabilizado Haake K15, a um termocirculador de água DC5B3 Haake e a um controlador térmico Peltier (TC 81,

Haake). Para análise foi utilizado o sistema de medida cone-placa com o sensor C60/2Ti (raio $R = 30$ cm, ângulo $b = 2^\circ$, fenda $h = 0,105$ mm e volume 2 cm³). As amostras foram colocadas no sensor com o auxílio de uma colher plástica. Para prevenir a evaporação do solvente foi aplicada uma camada de óleo mineral ao redor da placa de análise e foi usada uma campânula. As medidas foram realizadas em duplicata. A fim de verificar a estabilidade das preparações de κ -carragenana nativa e C6 oxidada na presença e ausência do K^+ , após 48 h de preparo das amostras, os mesmos experimentos eram repetidos. Os dados coletados foram analisados pelo software RHEOWIN 3. Os resultados das análises reológicas foram atribuídos como média e desvio padrão da média para a duplicata, obtidos pelo software Prisma ®.

3.5.1 Varreduras de tensão

As varreduras de tensão foram executadas no modo de tensão controlada (CS) a 20 °C, com variação da amplitude da tensão de $0,01$ até 15 Pa, para a escolha da tensão onde os materiais se encontrariam na região de viscoelasticidade linear (RVL). Para o teste foi fixado a frequência de $0,1$ Hz. A tensão escolhida foi utilizada nas análises de varredura de frequência e rampas de temperatura, de modo a preservar a estrutura do gel em análise.

3.5.2 Varreduras de frequência

As varreduras de frequência foram realizadas em modo CS a 20 °C, com a variação da frequência de $0,01$ Hz até 10 Hz, dentro da região viscoelástica linear de tensão, gerando o espectro mecânico das amostras com os valores dos módulos elástico G' e viscoso G'' em função da frequência. Foi realizada uma varredura de frequência antes e após as análises dinâmicas termomecânicas (ADTM).

3.5.3 Análises dinâmicas termomecânicas (ADTM)

Para determinar a dependência dos módulos de G' e G'' em função da variação de temperatura, foram mantidas constantes a frequência (de $0,1$ ou 1 Hz), a taxa de aquecimento/resfriamento e a tensão ($0,1$ ou 1 Pa) e procedeu-se de acordo

com os seguintes passos: a) as amostras foram aquecidas de 20°C a 80°C a uma taxa de 1°C/min; (b) período isotérmico de 900 s; (c) rampa de resfriamento de 80°C até 20°C na mesma taxa.

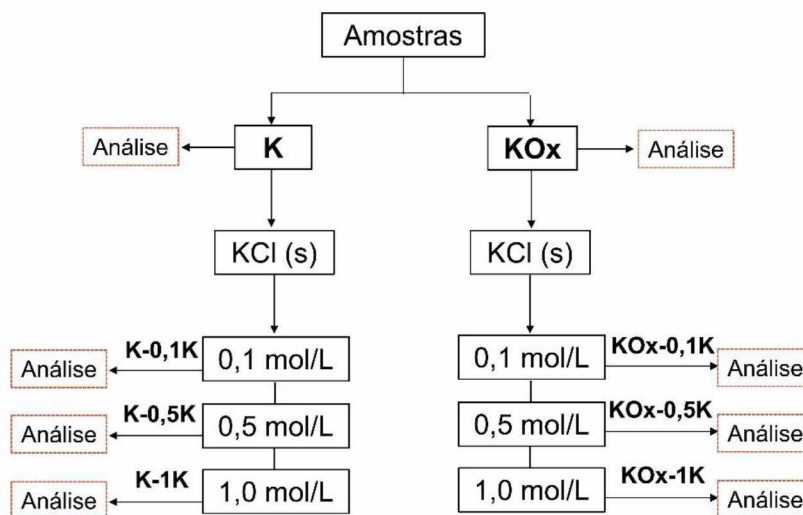
3.5.4 Análise da temperatura de gelificação e fusão

A temperatura de fusão (T_f) foi definida como o *crossover* entre o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') no aquecimento de 20 °C a 80 °C. A temperatura de gelificação (T_g) foi definida como o *crossover* entre o módulo de perda (G'') e o módulo de armazenamento (G') no resfriamento de 80 °C a 20 °C. Estas análises foram realizadas com variação constante de temperatura, a uma taxa de 1,0 °C/min.

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES REOLÓGICAS DINÂMICO OSCILATÓRIAS

KCl (Sigma Aldrich) foi solubilizado em 20 mL de água ultrapura para obtenção das concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mol/L do íon K^+ . Em seguida, 10 g/L da fração K (Kappa-carragenana nativa) ou KOx (C6 oxidada) foi adicionada paulatinamente na solução (0,2 g) com o íon dissolvido gerando a partir da κ -carragenana (K, K-0,1K, K-0,5K, K-1K) e da κ -carragenana oxidada (KOx, KOx-0,1K, KOx-0,5K, KOx-1K) (FIGURA 9). Cada mistura permaneceu vedada sob agitação (\approx 200 rpm) em banho-maria por 15 h a 30 °C. Então, as amostras foram submetidas a aquecimento a 70 °C, temperatura acima do ponto de fusão do gel formado, a fim de ficarem totalmente homogêneas por 2 h (Adaptado de GABRIELE; SPYROPOULOS; NORTON, 2009).

FIGURA 9 - ESQUEMA DAS AMOSTRAS ANALISADAS.



FONTE: O autor (2019).

3.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO*

As amostras κN , κOP , κOT , i/vN , i/vOT , iN , iOT , λN , λOP , λOT , θN , θOP e θOT foram testadas frente ao teste anticoagulante Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT) utilizando um Kit Hemosil® (Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA, USA) em coagulômetro de 4 canais, modelo KL-340 coagulation analyzer. O plasma ovino utilizado foi coletado com 8,7 % de citrato de sódio (Lote 014/13, cedido pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM). Como padrão positivo foi utilizada Heparina sódica (UFH-192.0 IU/mg) (Merck). Para os testes, 100 μ l de solução salina ou 100 μ l da solução de polissacarídeo foram incubados em variadas concentrações ou o padrão de heparina, mais 100 μ l de plasma ovino a 37 °C por 1 min. Em seguida, adicionou-se 100 μ l do reagente aPTT, re-incubou-se por 3 min, adicionou-se 100 μ l de $CaCl_2$ 0,25 mol/L e então, o tempo de coagulação foi determinado em triplicata para cada concentração. O tempo máximo de ensaio foi de 300 s.

3.8 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO K E KO PARA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS

Para o estudo das condições de hidrólise, a amostra KO (240 mg) foi solubilizada em água destilada (21,6 mL) a 70 °C. Em seguida foi adicionado TFA

1 mol/L (2,4 mL) (concentração final 0,1 mol/L) e a mistura foi hidrolisada em estufa, sob três temperaturas diferentes, com tempos de hidrólise variando entre 1 h e 8 h. A cada intervalo de uma hora, um vial com tampa contendo uma alíquota de 3 mL era retirado, resfriado, e o ácido presente no meio da reação era removido através de co-destilação em pressão reduzida com água destilada (3 vezes consecutivas) e tolueno (3 vezes consecutivas), liofilizado e depois analisado por RMN de ^1H .

As hidrólises ácidas parciais em escalas preparativas de KO (1 g e 700 mg) foram realizadas seguindo o mesmo método descrito acima, por 3 h a 85 °C e 5h a 65 °C. Após evaporação do TFA conforme descrito anteriormente, as misturas foram liofilizadas. A hidrólise a 85 °C deu origem a fração KOh enquanto a realizada a 65 °C originou KOhb.

As amostras KOh e KOhb tiveram suas aldoses convertidas para a forma alditol por meio da redução do grupamento aldeído com borohidreto de sódio de acordo com Figueiredo (2013). Para isso, os produtos de hidrólise das duas frações hidrolisadas foram solubilizados em água (15,8 e 11,1 mL) e em seguida, o borohidreto de sódio (218 e 134 mg) foi adicionado. As duas soluções foram mantidas sob agitação em banho de gelo por 4 horas. Em seguida, procedeu-se à evaporação em pressão reduzida seguida de liofilização, gerando as frações KOhr e KOhbr.

A fração K contendo principalmente *kappa*-carragenana foi hidrolisada de acordo com o método de hidrólise ácida parcial descrito por Ducatti et al. (2011). A fração K (750 mg) foi dissolvida em água destilada (67,5 mL) a 60 °C. Após resfriamento da mistura, foi adicionado TFA 1 mol/L (7,5 mL) e a mistura foi incubada em estufa a 65°C. Após 3 h, o ácido presente no meio da reação foi removido através de co-destilação em pressão reduzida com água destilada (3 vezes consecutivas) e tolueno (3 vezes consecutivas) e liofilizada sendo nomeada Kh.

Para conversão das aldoses para sua forma alditol, estes foram submetidos à redução do grupamento aldeído com borohidreto de sódio (141 mg). O material foi solubilizado em água destilada (11,25 mL) e mantida sob agitação em banho de gelo por 4 horas. Após isso, procedeu-se à evaporação em pressão reduzida da mistura seguida de liofilização, gerando a fração Khr.

3.8.1 Métodos cromatográficos aplicados na purificação dos oligossacarídeos alditóis

3.8.1.1 Cromatografia em coluna aniônica

As frações KOhr, KOhr e Khr foram purificadas utilizando cromatografia de troca aniônica. As amostras foram solubilizadas em água e aplicadas em coluna (20 cm x 2,1 cm d.i) DEAE-Sephadex A-25 (GE Healthcare) contendo 280 mL de gel. A eluição foi realizada com água destilada e em seguida com diferentes concentrações molares de carbonato de amônio – 0,05 mol/L; 0,075 mol/L; 0,100 mol/L; 0,125 mol/L; 0,150 mol/L; 0,175 mol/L; 0,2 mol/L e 0,4 mol/L. Frações foram coletadas em tubo de ensaio manualmente. A presença de carboidratos foi detectada através da reação frente à solução de fenol 5% (0,5 ml) e ácido sulfúrico concentrado (2,5 ml), conforme descrito por Dubois e colaboradores (1956).

A presença dos sais borohidreto de sódio e carbonato de amônio foi indiretamente monitorada por condutivímetro (Jenway, modelo 4510). O eletrodo foi colocado dentro do tubo de ensaio com a fração coletada, era anotado o valor da leitura, e, em seguida o eletrodo era enxaguado com água destilada.

Os tubos contendo carboidratos foram agrupados, concentrados e liofilizados rendendo as subfrações.

3.8.1.2 Cromatografia de exclusão

As subfrações obtidas pro cromatografia de troca iônica foram purificadas utilizando cromatografia de exclusão em coluna (19 cm x 1,4 d.i) contendo Bio-Gel P-2 (Bio-Rad), que apresenta limite de exclusão de 100 a 1800 Da. Os oligossacarídeos foram solubilizados na concentração de 2 mg/mL, eluídos com água destilada com fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 2,5 mL foram coletadas utilizando um coletor (bio Rad, USA) e os carboidratos foram detectados pelo método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e condutividade.

3.8.1.3 Conversão do contraíon amônio para sódio

A fim de trocar o contra íon dos grupos ácidos dos oligossacarídeos alditóis por sódio, as frações purificadas por cromatografia de exclusão foram solubilizadas e aplicadas em resina trocadora de cátions (Dowex 50w x8) na forma sódica (Na^+). Para a utilização da resina, inicialmente ela foi lavada com etanol, acetona, seguida por água ultrapura até condutividade zero. Após essa preparação da resina, o eluato foi filtrado em membranas de 20 μm e liofilizado.

3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.9.1 Análise por cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos e índice de refração (HPSEC-RI/MALLS)

Para a determinação de homogeneidade e massa molar relativa das carragenanas estudadas foi utilizado o cromatógrafo Waters de exclusão por tamanho de alta eficiência acoplado aos detectores de de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS), (modelo DSP-F, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) e de índice de refração diferencial (RI), modelo Waters 2410 e Para a separação cromatográfica foi utilizado 4 colunas de gel permeação Ultrahydrogel™ 2000, 500, 250 e 120 conectadas em série com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$ Da, respectivamente. A fase móvel utilizada foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 100 ppm/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min, pressão de ~800 psi a 25 °C, controladas por bomba WATERS 515 (WYATT, 1993). Os cromatogramas foram registrados e analisados através do software ASTRA versão 450. O preparo das amostras está descrito a seguir.

3.9.1.1 Determinação da homogeneidade

Para a análise de homogeneidade, as amostras foram solubilizadas na concentração de 1,0 mg/mL em solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol/L contendo azida de sódio (NaN_3) 0,2 g/L, e filtradas em membrana de nitrocelulose (Hexis Científica S/A), com poros de 0,2 μm . Em seguida foram injetadas no

cromatógrafo acoplado aos detectores RI/MALLS. Os cromatogramas foram registrados e analisados através do software ASTRA versão 450.

3.9.1.2 Determinação da massa molar relativa

As massas molares relativas (M_w) foram estimadas utilizando uma curva padrão de dextrana. A TABELA 2 apresenta os tempos de retenção (min) usando o detector de índice de refração e as massas molares dos padrões de dextrana.

TABELA 2 - TEMPO DE RETENÇÃO, M_w E PARÂMETROS DAS CURVAS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO

Padrão	M_w^a ($\times 10^3$ g/mol)	Tempo de retenção (min)	Log M_w	Curva de calibração
	2000	37,9	6,30	
	487	43,9	5,69	
Dextrana	266	44,4	5,42	$y = -0,1741x + 13,237$ $R^2 = 0,9879$
	78	48,0	4,89	
	40	49,2	4,60	
	9	53,4	3,97	

FONTE: O autor (2019).

NOTAS: x = tempo de retenção (min); y = log M_w ; R^2 = coeficiente de determinação

^a M_w de acordo com as especificações do fabricante

As curvas padrões de calibração para os padrões de dextrana foram plotadas em uma escala de log das massas molares dos padrões contra o tempo de retenção (min) e apresentaram linearidade (coeficientes de determinação, $R^2 = 0,9879$, respectivamente).

3.9.2 Determinação de ácido urônico

Para o acompanhamento da oxidação seletiva nas carragenanas foi utilizada a dosagem de ácidos urônicos baseado no método Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Cada amostra foi solubilizada em água deionizada (1 mg/mL) e 100 μ L foram pipetados em quatro tubos de ensaio e completados para 400 μ L com água deionizada. Nos quatro tubos foram adicionados 40 μ L de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 mol/L em pH 1,6 e 2,4 mL de H_2SO_4 em grau analítico (96,4%) contendo tetraborato de sódio 75 mmol/L. Os tubos foram agitados em agitador tipo

Vortex (VM3000), tampados com bolas de gude e em seguida, aquecidos em banho-maria a 100 °C por 20 min. Em seguida, a temperatura foi diminuída em banho de gelo, para diminuição rápida da temperatura. Adicionou-se 80 µL de solução 3-fenilfenol a 0,15 % (p/V) em NaOH a 0,5 % (p/V) em três dos quatro tubos e agitou-se. O tubo sem 3-fenilfenol refere-se ao branco da amostra.

De cada tubo foi pipetado 200 µL para microplaca de 96 poços e então foi lida a absorbância em 525 nm em espectrofotômetro automático para microplacas da marca BioTek. A concentração de ácidos urônicos na amostra foi determinada contra branco e curva padrão de ácido D-galacturônico (0,01 a 0,04 mg/µL). Cada leitura foi realizada em triplicata. O branco do equipamento foi feito substituindo o padrão por 400 µL de água deionizada com adição dos demais reagentes.

3.9.3 Determinação do grau de sulfatação ($DS_{\text{Sulfatação}}$)

O teor de sulfato foi determinado pelo método turbidimétrico (DODGSON, 1960; DODGSON; PRINCE, 1962), onde as carragenanas (1 mg/ml) foram hidrolisadas com HCl 1 mol/L por 5 horas em estufa a 110 °C . O grau de substituição ($DS_{\text{Sulfatação}}$) dos polissacarídeos foi calculado a partir da Equação 3 (WHISTLER; SPENCER, 1964):

$$DS_{\text{Sulfatação}} = (306,37 \times S) / [3200 - (102 \times S)] \quad (3)$$

onde:

306,27 = representa 1 mol da unidade dissacarídica repetitiva G-DA nas carragenanas;

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

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

S = representa o teor de enxofre dado em porcentagem, que é calculado a partir da dosagem do sulfato.

3.9.4 Quantificação de carboidratos totais

O conteúdo de carboidratos totais foi determinado pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando uma curva padrão de glucose.

3.9.5 Quantificação de 3,6-Anidrogactose

O conteúdo de 3,6-Anidro-Galp das carragenanas oxidadas foi determinado pelo método do resorcinol descrito por Yaphe e Arsenault (1965) utilizando uma curva padrão de frutose.

3.9.6 Determinação da composição monossacarídica

A composição monossacarídica foi determinada pelo método de hidrólise redutiva de Stevenson e Furneaux (1991) utilizando como agente redutor o complexo 4-metilmorfolina (FALSHAW; FURNEAUX, 1994; JOL et al., 1999). Após a acetilação, os alditóis acetato foram extraídos com CHCl_3 , e as amostras foram analisadas em cromatógrafo GLC-FID (Trace GC Ultra, Thermo Electronic Corporation) equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm) DB-225MS (Durabond). O equipamento foi programado para 100 °C por 1 min e de 100 até 230 °C na taxa de 60 °C/min⁻¹ utilizando como gás de arraste o gás hélio com fluxo de 1,0 mL/min. Os cromatogramas foram analisados e integrados em software Saturn Workstation 5.1.

3.10 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.10.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C

As análises de RNM foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX operando a frequências de 400,13 e 600,13 MHz para ¹H, no Centro de Ressonância Nuclear, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Os espectros foram interpretados com o auxílio do programa TOPSPIN™ 3.5 da Bruker e ACD/Labs NMR Processor Academic Edition.

As análises de ressonância magnética dos oligossacrídeos foram realizados em equipamento da marca Varian, em 500,13 e 600,13 MHz, em água deuterada (D_2O) 99 %, a temperaturas de 25 ou 60 °C, no Departamento de Química da University of Ireland, Galway, Irlanda. Os espectros foram processados e analisados utilizando o software MestreNova.

Para todas as análises, os experimentos foram realizados utilizando tubos de 5 mm de diâmetro externo em água deuterada. Os deslocamentos químicos foram determinados utilizando acetona com grau de pureza HPLC (Tedia) como padrão interno: $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ para ^{13}C . Os deslocamentos da acetona foram determinados utilizando o 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio ($\delta = 0$ ppm para ^1H e ^{13}C) como padrão interno, conforme recomendações da IUPAC (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004).

3.10.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas no Departamento de Farmácia da UFPR, em espectrômetro FT-IR ALPHA (Bruker, Germany) incorporado a transformada de Fourier. As amostras liofilizadas (2 mg) foram colocadas diretamente no laser e os espectros foram obtidos instantaneamente. Para a análise foi utilizado o software OPUS Viewer (Bruker).

3.10.3 Espectrometria de massas do tipo Electrospray

Espectros de baixa e alta resolução foram obtidos em um instrumento LCT Premier XE (Waters), TOF, em ambos os modos positivo e/ou negativo usando H_2O e MeOH como solvente. Os espectros foram registrados a uma voltagem de ionização de 6 keV com um instrumento VG 70-70 EQ. As amostras foram solubilizadas em metanol e acetonitrila. Aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5.

3.10.4 Espectrometria de absorção atômica por chama (fotometria de chama)

A espectrometria de absorção atômica por chama foi realizada no Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas (LPH) da UFPR para determinação dos íons sódio e potássio. As amostras foram solubilizadas na concentração de 1 mg/mL em ácido nítrico 1%. Foi feita uma diluição de 10 vezes e em seguida foram lidas diretamente no fotômetro de chama CELM, modelo FC 280. A chama foi de gás natural sob atmosfera de gás oxigênio.

3.10.5 Microscopia eletrônica de Varredura

As amostras K, K-0,5K, KOx e KOx-0,5K foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Model VEGA3 LMU, Tescan, Kohoutovice, República Tcheca), equipado com detector de dispersão de energia de Raios-X (EDS) do tipo SDD (silicon drift detector) (80 mm²), no Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura, da Universidade Federal do Paraná. As micrografias foram obtidas em uma voltagem de aceleração de 15 kV e analisadas com software AZ Tech Advanced. Filmes sólidos foram formados após quatro deposições sucessivas de uma fase líquida de κ-carragenana 10 mg/mL acrescida de 0,5 mol/L de KCl, preparada como no item 3.6, sob o suporte de alumínio a 40 °C. Em seguida, os filmes formados foram submetidos à uma cobertura metálica de ouro por 2 min com espessura de 10 nm, sob atmosfera de argônio, utilizando equipamento para revestimento metálico (Modelo SCD 030, Pfeiffer, Balzers, Liechtenstein).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITOS DO GRUPO CARBOXÍLICO NA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE CARRAGENANAS OXIDADAS

4.1.1 Origem, obtenção e caracterização das carragenanas *kappa*-, *iota/nu*-, *iota*-, *lambda*- e *theta*-

As carragenanas nativas, *kappa* (κ N)-, *lambda*- (λ N) e o híbrido *iota/nu*- (ι/ν N) já estavam disponíveis no laboratório e foram obtidas previamente como reportado por Araújo et al. (2013). As carragenanas *iota* (ι N)- e *theta* (θ N) foram obtidas a partir das carragenanas ι/ν N e λ N, respectivamente, depois da ciclização química das unidades α -D-Galp-2,6-dissulfato em 3,6-anidro- α -D-galactose (CIANCIA et al., 1993; VIANA et al., 2004). O procedimento de extração, tratamento alcalino e caracterização dessas frações por RMN de ^1H e ^{13}C e espectroscopia de FTIR foram descritos em Santos (2015).

Para a quantificação dos monossacarídeos neutros presentes, as frações κ N, λ N, ι N, θ N e ι/ν N foram submetidas ao processo de hidrólise ácida, redução e acetilação. Os acetatos alditóis foram analisados por GLC. Este resultado está representado na TABELA 3.

As análises de composição monossacarídica dos polissacarídeos mostraram galactose e 3,6-anidrogalactose como monossacarídeos majoritários. Ainda foram identificadas menores proporções de glucose, xilose e manose (TABELA 3). Estes resultados foram similares aos estudos previamente reportados descrevendo a estrutura química de *kappa*-, *iota*-, *iota/nu*- e *lambda*-carragenanas (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004; STEVENSON; FURNEAUX, 1991; VIANA et al., 2004)

Na TABELA 3 também é possível observar a quantificação das díades realizada por RMN de ^1H . As porcentagens de díades majoritárias na cadeia polissacarídica foram calculadas pela integração dos hidrogênios α -anoméricos nos espectros de RMN de ^1H (SANTOS, 2015) (FIGURA 10) e estão de acordo com o que é relatado na literatura (VAN DE VELDE et al., 2002).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E DAS DÍADES, RENDIMENTO, CONTEÚDO DE SULFATO E MASSA MOLAR MÉDIA (M_w) DAS CARRAGENANAS κ N, i/v N, i N, λ N, E θ N

Amostra ^a	Díades majoritárias (%) ^b	Rendimento (%) ^c	Composição monossacarídica (mol %) ^d	DS ^e	M_w (g/mol) ^f
κ N	G4S-DA (88)	40	6-Me-Gal (2,5)	1,0	360.000
	G4S-DA2S (10)		AnGal (45,4)		
i/v N	G4S-D6S (2)	64	Gal (51,2)	2,3	84.000
	G4S-DA2S (66)		Glc (0,7)		
	G4S-D2S,6S (12)		Xyl (0,2)		
	G4S-D6S (15)		AnGal (33,7)		
i N	G4S-DA (7)	30	Gal (60,0)	1,8	70.000
	G4S-DA2S (84)		Xyl (3,5)		
	G4S-D6S (9)		Man (0,5)		
λ N	G4S-DA (7)	53	Glc (2,3)	3,0	578.000
	G2S-D2S,6S (100)		AnGal (35,5)		
θ N		46	Gal (60,9)	2,0	237.000
	G2S-DA2S (100)		Xyl (2,0)		
			Glc (1,6)		
			AnGal (0,4)		
			Gal (98,1)		
			Glc (1,5)		
			AnGal (47,6)		
			Gal (51,8)		
			Glc (0,6)		

FONTE: O autor (2019).

NOTA: ^a κ N = *kappa*-carragenana, i/v N = híbrido *iota/nu*-carragenana, i N = *iota*-carragenana, λ N = *lambda*-carragenana, θ N = *theta*-carragenana.

^b As díades foram calculadas por análise de RMN de ¹H (VAN DE VELDE et al., 2002).

^c Baseados no peso da alga seca.

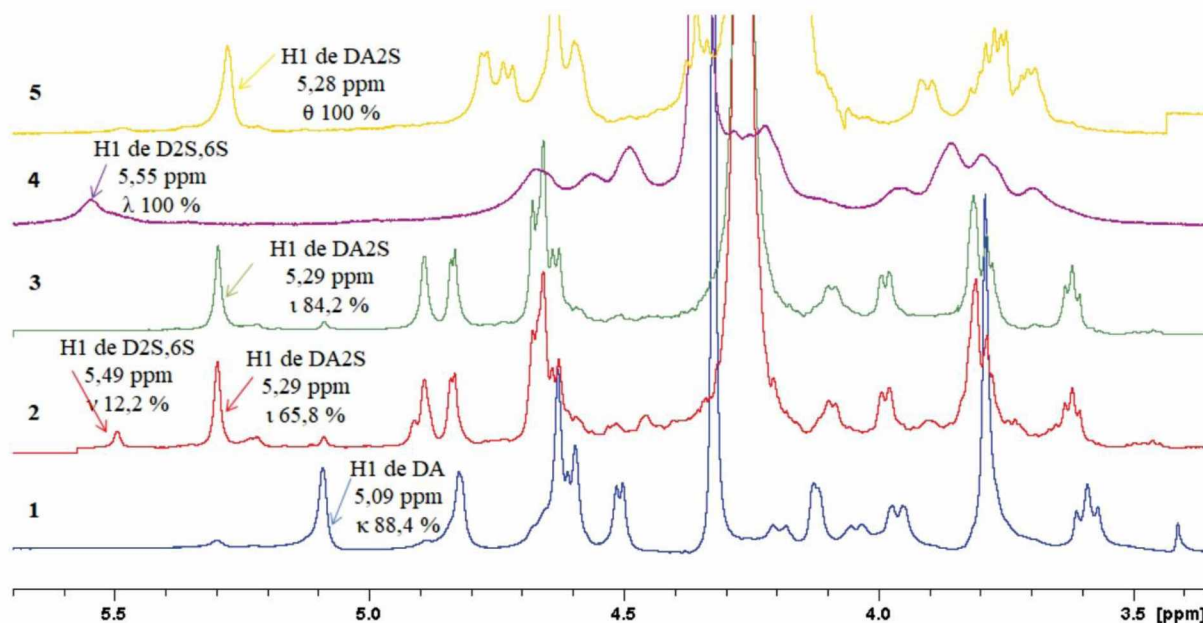
^d A composição monossacarídica foi determinada por análises de GLC-FID. 6-Me-Gal, AnGal, Gal, Xyl, Man e Glc correspondem a 6-O-metilgalactose, 3,6-anidrogactose, galactose, xilose, manose e glucose, respectivamente.

^e O teor de sulfato e o grau de substituição (DS) foram determinados de acordo com Dodgson, (1960) e Dodgson e Prince (1962) com o uso da equação 3.

^f A massa molar média (M_w) foi determinada por HPSEC-MALLS-RI.

^g O código de letras foi baseado na nomenclatura descrita na literatura (KNUTSEN et al., 1994). G, DA e D referem-se as unidades β -D-Galp, 3,6-anidro- α -D-Galp e α -D-Galp, respectivamente. Os números referem-se ao átomo de carbono ligado ao grupo sulfato (S).

FIGURA 10 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES κN (1), $\iota/\nu\text{N}$ (2), ιN (3), λN (4) E θN (5)



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Espectros realizados em 400 MHz, 70 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).

As porcentagens das díades foram calculadas por análise de RMN de ^1H (VAN DE VELDE et al., 2002).

Código de letras nos espectros baseado na nomenclatura descrita na literatura (KNUTSEN et al., 1994).

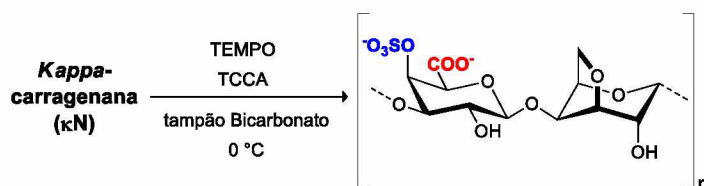
As análises químicas e a composição monossacarídica confirmaram que as amostras são constituídas por polissacarídeos sulfatados formadas por unidades majoritárias de galactose e 3,6-anidrogactose, confirmando que correspondem às carragenanas esperadas.

4.1.2 Oxidação seletiva das frações κN , $\iota/\nu\text{N}$, ιN , θN e λN

A oxidação em C6 das unidades $\beta\text{-D-Galp}$ em carragenanas é reportada como um método eficiente para converter galactose em derivados de ácido urônico (FORGET et al., 2013; COSENZA et al., 2015). Desde 2013, reações de oxidação seletiva empregando a κ -carragenana (κN) como substrato (SANTOS, 2015), TEMPO e TCCA (LUCA et al., 2003) em tampão de carbonato (pH = 9,6) vêm sendo estudadas neste grupo de pesquisa (FIGURA 11). O estudo de otimização (SANTOS, 2015) mostrou que aumentando a quantidade de TCCA, independentemente do tempo de reação, promoveu a diminuição da intensidade dos

sinais, H5/H6 no espectro de RMN de ^1H (SANTOS, 2015, p.80-82), indicando a oxidação seletiva do álcool primário nas unidades de $\beta\text{-D-Galp-4-sulfato}$.

FIGURA 11 - OXIDAÇÃO SELETIVA C6 DE KN UTILIZANDO TEMPO E TCCA.



FONTE: O autor (2019).

Dando sequência a este estudo, as frações κN, λN e θN foram submetidas à reações em grande escala utilizando a condição 3 equiv. de TCCA por 2 h, do estudo de otimização, gerando as frações κOT, λOP e θOP, respectivamente. O grau de oxidação (DOx) da amostra κOT foi estimado utilizando o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 12) através do monitoramento das intensidades de H5 e H6a/H6b (sinais sobrepostos) e H2 em 3,79 e 3,59 ppm, respectivamente, das unidades de $\beta\text{-D-Galp}$. Para a amostra λOP e θOP foram utilizadas as áreas correspondentes aos H6 e H5 (3,68 e 3,82 ppm) da unidade $\beta\text{-D-Galp}$ e o sinal de H1 da unidade alfa (5,55 ppm para a 3,6-anidro- $\alpha\text{-D-Galp}$ ou 5,28 ppm para $\alpha\text{-D-Galp}$) (Equação 2). Um alto grau de oxidação foi encontrado para essas amostras, sendo estes 95, 83 e 80 % de oxidação, respectivamente (TABELA 4).

TABELA 4 - DOX, MASSA MOLAR (M_w) E ANÁLISE QUÍMICA DAS CARRAGENANAS C6 OXIDADAS.

Derivado oxidado	TCCA (Equiv)	Rendimento (%) ^a	Tempo (h)	DOx (%) ^b	GalA:AnGal:SO ₄ ^c	DS ^d	M_w (g/mol) ^e
κOP	1	65	15	46	1,0:2,8:1,0	1,0	23.000
κOT	3	83	2	> 95	1,0:1,5:0,6	0,9	12.000
ιOT	3	60	15	>95	1,0:1,6:1,3	1,5	33.000
ινOT	3	46	15	95	1,0:1,6:1,0	1,0	17.000
λOP	3	77	2	83	1,0:0,3:1,8	2,5	293.000
λOT	3	75	15	>95	1,0:0,3:0,8	2,1	224.000
θOP	3	74	2	80	1,0:1,7:0,9	1,7	162.000
θOT	3	81	15	>95	1,0:1,2:0,8	1,4	92.000

FONTE: O autor (2019).

NOTA: ^a Os rendimento foram calculados depois da diálise e liofilização.

^b O grau de oxidação (DOx) foi calculado por análise de RMN de ^1H .

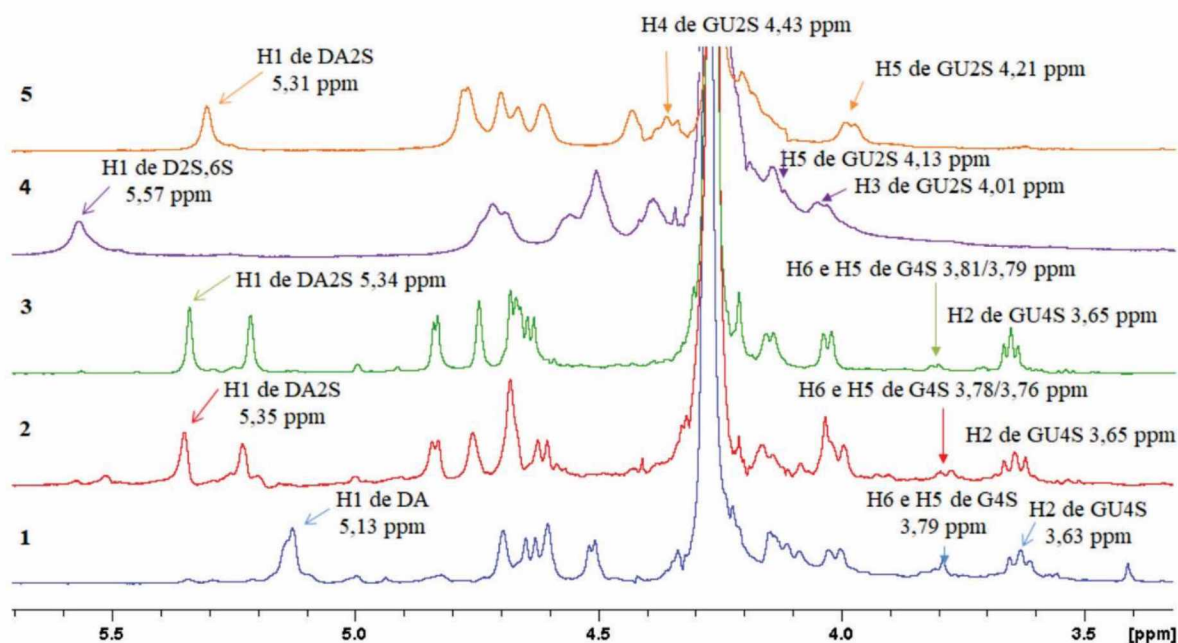
^c GalA, AnGal e SO₄ correspondem a ácido galacturônico, 3,6-anidrogactose, galactose, e sulfato, respectivamente.

^d O teor de sulfato e o grau de substituição (DS) foram determinados de acordo com Dodgson (1960) e Dodgson e Prince (1962) com o uso da equação 3.

^e A massa molar média (M_w) foi determinada por HPSEC-MALLS-RI.

Com o objetivo de aumentar o grau de oxidação, as amostras κ N, ι /vN, λ N e θ N foram submetidas a um tempo de reação mais longo (15 h) na presença do reagente TEMPO, onde foram obtidas as frações ι OT, ι /vOT, λ OT e θ OT, respectivamente (TABELA 4). As análises de RMN de 1 H indicaram um DOx maior do que 95 % para essas amostras (FIGURA 12).

FIGURA 12 - ESPECTROS DE RMN DE 1 H DOS DERIVADOS OXIDADOS κ OT (1), ι /vOT (2), ι OT (3), λ OT (4) E θ OT (5) UTILIZANDO O SISTEMA TEMPO/TCCA.



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Espectros realizados em 400 MHz, 70 °C em D₂O, acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).

As díades foram calculadas por análise de RMN de 1 H (VAN DE VELDE et al., 2002).

Código de letras nos espectros baseado na nomenclatura descrita na literatura (Knutsen et al., 1994).

Como para κ OT obteve-se um DOx de 95 % com apenas 2 h de reação de oxidação seletiva, para a obtenção de um menor grau de oxidação foi utilizada uma condição de reação com 1 equiv. de TCCA, gerando a fração κ OP com DOx de 46%.

Em todas as reações de oxidação seletiva (FIGURA 12) após a finalização das reações foi adicionado NaBH₄ com o objetivo de reduzir terminais redutores eventualmente formados e reações de oxidação incompletas, que estivessem na forma intermediária de aldeído. Nessa condição, a oxidação em C2 de 3,6-anidro- α -D-Galp relatada por Cosenza e colaboradores (2015) não foi observada.

As oxidações também foram confirmadas colorimetria para estimar o conteúdo de ácido urônico na cadeia polissacarídica (TABELA 4). A caracterização de todas as frações oxidadas e nativas por RMN de ^1H e ^{13}C , e a espectroscopia de FTIR foram descritos em Santos (2015). O assinalamento completo de ^1H e ^{13}C das díades sulfatadas e oxidadas das carragenanas é mostrada na TABELA 5.

TABELA 5 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DAS CARRAGENANAS NATIVAS E OXIDADAS

Fração	Unidade		1 ^c	2	3	4	5	6	
								6a	6b
κN	G4S ^b	^1H ^a	4,61	3,59	3,95	4,81	3,79	3,79	
		^{13}C ^a	104,5	71,54	80,9	76,2	76,7	63,30	
	DA	^1H	5,09	4,12	4,50	4,59	4,62	4,04	4,19
		^{13}C	97,19	71,9	81,2	80,3	78,8	71,4	71,4
κOT	GU4S ^b	^1H	4,63	3,63	4,00	5,15	4,27	-	
		^{13}C	104,2	71,2	80,9	77,4	76,1	174,4 ^d	
	DA	^1H	5,13	4,14	4,51	4,60	4,70	4,11	4,22
		^{13}C	97,2	71,9	81,2	80,4	78,7	71,6	71,6
ιN	G4S	^1H	4,64	3,62	3,99	4,89	3,80	3,81	
		^{13}C	104,47	71,43	79,06	74,31	77,17	63,51	
	DA2S	^1H	5,29	4,66	4,83	4,68	4,75	4,25	4,09
		^{13}C	94,0	77,42	80,11	80,40	79,53	71,8	71,8
ιOT	GU4S	^1H	4,63	3,65	4,02	5,21	4,22	-	
		^{13}C	103,8	70,9	79,0	75,2	76,0	174,9	
	DA2S	^1H	5,34	4,74	4,83	4,68	4,66	4,30	4,14
		^{13}C	93,9	79,0	79,8	80,4	77,0	71,8	71,8
λN	G2S	^1H	4,69	4,49	3,97	4,26	3,68	3,79	3,86
		^{13}C	105,24	79,43	76,05	66,24	76,73	63,2	63,2
	D2S,6S	^1H	5,55	4,67	4,28	4,23	4,57	4,26	4,22
		^{13}C	93,62	77,69	71,51	82,29	70,69	70,0	70,0
λOT	GU2S	^1H	4,72	4,28	4,04	4,49	4,13	-	
		^{13}C	104,9	82,0	77,6	68,0	76,7	176,0	
	D2S,6S	^1H	5,57	4,51	4,68	4,65	4,56	4,37	4,21
		^{13}C	93,9	78,9	77,8	77,5	71,0	71,1	71,1
θN	G2S	^1H	4,76	4,37	3,91	4,14	3,71	3,77	
		^{13}C	102,6	79,8	79,5	69,8	77,0	63,2	
	DA2S	^1H	5,29	4,60	4,76	4,70	4,66	4,13	
		^{13}C	97,5	76,9	79,6	81,5	79,0	72,1	
θOT	GU2S	^1H	4,76	4,36	3,98	4,43	4,21	-	
		^{13}C	102,3	79,2	81,6	71,3	77,6	175,1	
	DA2S	^1H	5,31	4,61	4,77	4,70	4,67	4,19	
		^{13}C	97,8	76,8	79,3	79,2	80,1	72,2	

FONTE: O autor (2019).

NOTA: ^a Deslocamentos químicos (ppm) obtidos dos mapas de correlações heteronucleares HSQC e HSQC editado. Os deslocamentos de κHO e ιHO foram similares aos previamente reportados (COSENZA et al., 2015).

^b O código de letras foi baseado na nomenclatura para carragenanas descrita na literatura (KNUTSEN et al., 1994). G, GU, DA e D referem-se a unidades β-D-Galp, β-D-GalAp, 3,6-anidro-α-D-Galp e α-D-Galp, respectivamente. Os números referem-se ao átomo de carbono ligado ao grupo sulfato (S).

^c Os números referem-se aos carbonos ou hidrogênios nas unidades galactosil e 3,6-anidrogallactosil.

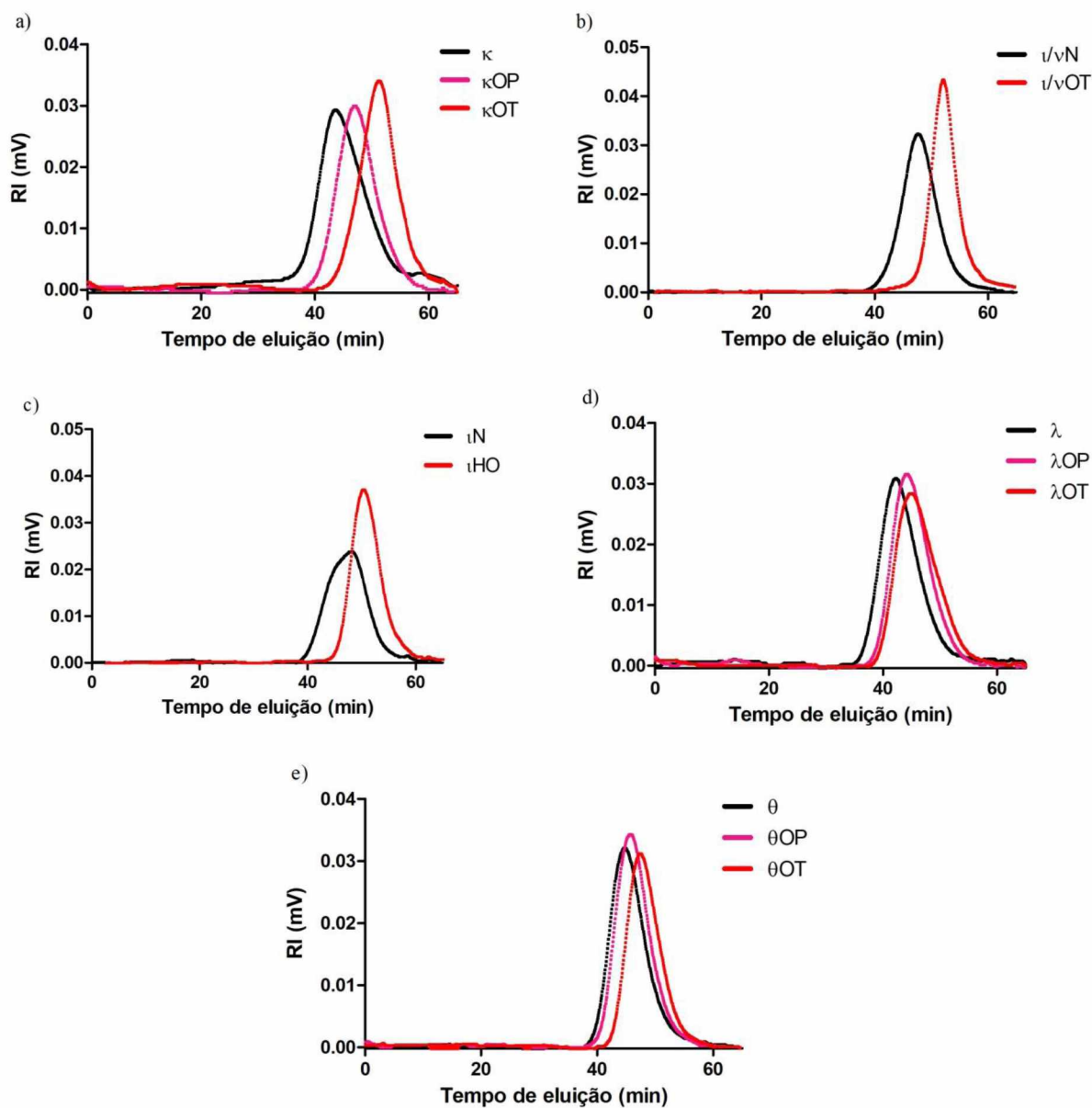
^d Assinalamentos obtidos em pH 4 a partir do espectro de RMN de ^{13}C como observado em Santos (2015, p. 86-87).

Os rendimentos de todas as carragenanas oxidadas após a purificação por diálise contra água destilada e liofilização foram em torno de 46 e 83 % (TABELA 4), mesmo quando algumas reações foram realizadas em escala de gramas.

Em relação a quantificação de sulfato, embora as análises de RMN de ^1H e ^{13}C não apresentaram deslocamentos que indicassem a perda de sulfato depois da oxidação com TEMPO/TCCA, a quantificação de sulfato turbidimétrica indicou uma menor quantidade deste para as amostras oxidadas (TABELA 4). Na literatura são relatadas diferenças na estabilidade de grupos sulfatos sobre condições ácidas de acordo com a posição onde estão ligados na estrutura de carragenanas (GONÇALVES et al., 2005). Este efeito associado a presença de unidades $\beta\text{-D-GalA}_p$ podem ser a razão do menor conteúdo de sulfato detectado pelo método turbidimétrico.

A homogeneidade das amostras κN , $\iota/\nu\text{N}$, ιN , θN , λN e seus derivados oxidados foram analisadas por HPSEC (FIGURA 13) usando o detector RI. Os perfis de eluição mostraram picos únicos eluindo em tempos de retenção entre 38 e 60 min, sugerindo amostras homogêneas. As massas molares relativas foram estimadas a partir da curva padrão com dextrana (TABELA 2) por meio de regressão linear. Para todos os derivados oxidados foi observada uma redução de Mw. Este efeito é frequentemente observado em reações de oxidação de polissacarídeos com o reagente TEMPO (COSENZA et al., 2015).

FIGURA 13 - PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) PARA AS AMOSTRAS a) κ N, κ OP E κ OT, b) i/v N E i/v OT, c) i N, i OP E i OT, d) λ N, λ OP E λ OT E e) θ N, θ OP E θ OT.



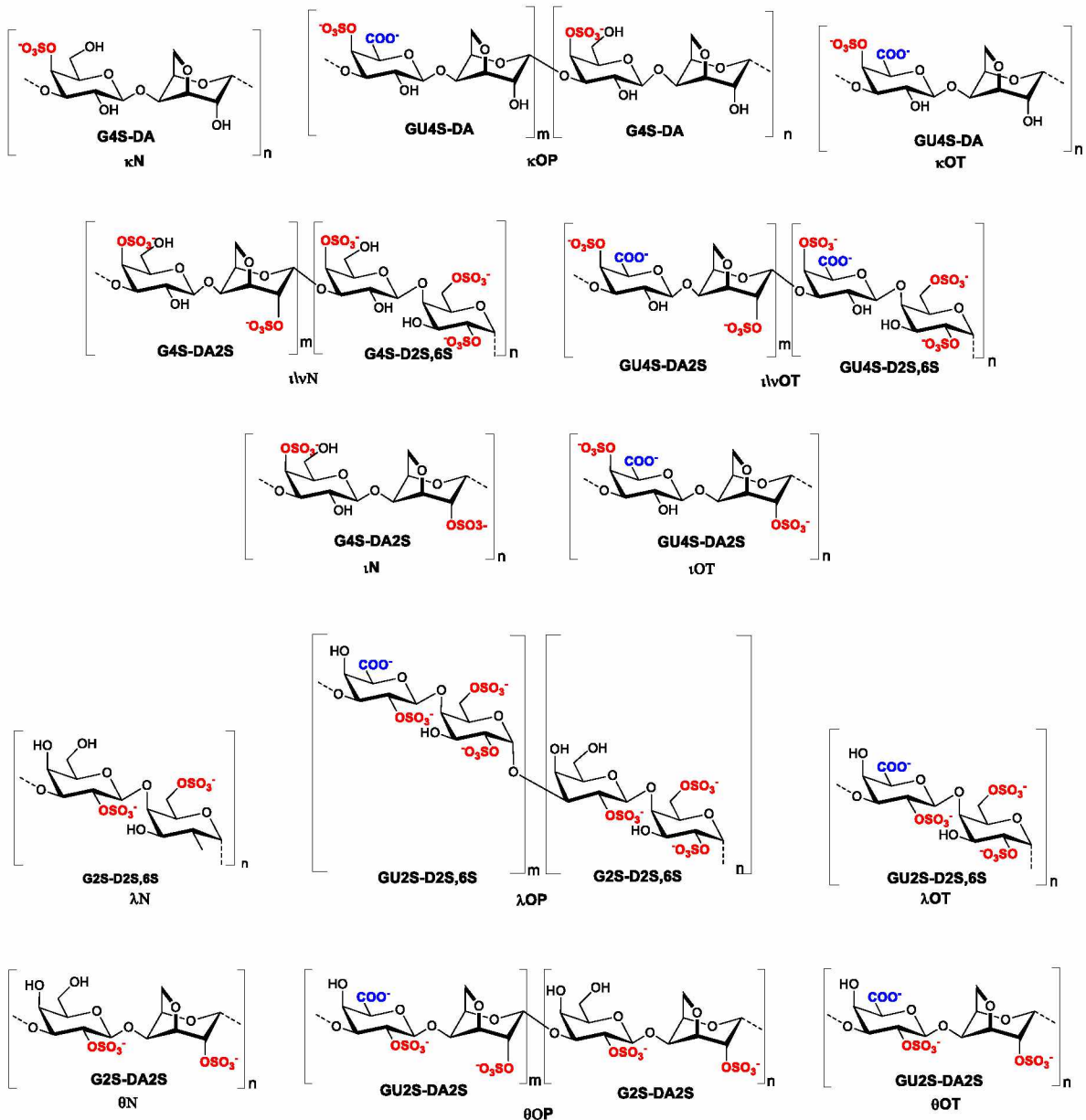
FONTE: O autor (2019).

4.1.3 Atividade anticoagulante *in vitro* das carragenanas *kappa*-, *iota/nu*-, *iota*-, *lambda*-, *theta*- e seus derivados oxidados

É relatado na literatura que galactanas sulfatadas obtidas a partir de algas vermelhas exercem seus efeitos anticoagulantes via um mecanismo serpino-dependente ou independente (MELO et al., 2004; GLAUSER et al., 2009; QUINDERÉ et al., 2014). O mecanismo serpino-dependente envolve a inibição da

trombina e do fator Xa via antitrombina e cofator II da heparina, enquanto o mecanismo independente inibe os complexos tenase intrínseca e protrombinase. A fim de obter informação a respeito da importância da regioquímica do sulfato e presença do ácido galacturônico nas carragenanas oxidadas, a atividade anticoagulante das carragenanas nativas (κ N, λ N, ι N, θ N e ι/ν N) e C6 oxidadas em diferentes graus de oxidação (κ OP, κ OT, ι/ν OT, ι OT, λ OP, λ OT, θ OP e θ OT) (FIGURA 14), foi avaliada pelo Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), que cobre a via intrínseca da cascata de coagulação.

FIGURA 14 - ESTRUTURAS DAS FRAÇÕES κ N, κ OP, κ OT, ι/ν N, ι/ν OT, ι N, ι OT, λ N, λ OP, λ OT, θ N, θ OP E θ OT.



FONTE: O autor (2019).

NOTA: As estruturas representam as díades alvo (n e m) modificadas e não refletem a exata composição das amostras.

Na TABELA 6 estão apresentadas as concentrações utilizadas e os resultados do teste de aPTT.

TABELA 6 - TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO (aPTT) DAS FRAÇÕES κN, κOP, κOT, ι/vN, ι/vOT, ιN, ιOT, λN, λOP, λOT, θN, θOP E θOT.

(continua)

Amostra	aPTT (s)							
	Concentração polissacarídica (µg/mL) ^a							
	20	30	40	50	100	150	200	300
κN	31,9 ± 0,9	32,9 ± 1,2	34,2 ± 0,1	37,5 ± 1,8	--	48,3 ± 0,8	--	95,7 ± 1,6
κOP	40,7 ± 0,5	49,0 ± 1,3	52,8 ± 1,7	62,3 ± 1,6	88,3 ± 0,5	124,7 ± 7,6	> 300	> 300
κOT	37,6 ± 0,1	39,3 ± 0,1	42,8 ± 1,5	52,0 ± 0,6	64,4 ± 1,0	78,6 ± 0,9	100,6 ± 1,0	> 300

Amostra	aPTT (s)						
	Concentração polissacarídica (µg/mL) ^a						
	10	20	30	40	50	100	150
ι/vN	37,1 ± 0,5	41,2 ± 0,5	56,1 ± 0,7	58,0 ± 0,3	58,0 ± 0,8	78,6 ± 0,9	102,0 ± 1,2
ι/vOT	36,0 ± 1,5	42,7 ± 0,8	48,1 ± 0,9	50,6 ± 1,4	52,0 ± 0,1	68,4 ± 0,1	83,8 ± 0,9

Amostra	aPTT (s)						
	Concentração polissacarídica (µg/mL) ^a						
	10	20	30	40	50	100	150
ιN	75,8 ± 0,9	98,1 ± 2,7	142,6 ± 8,2	149,7 ± 3,4	163,7 ± 1,7	239,3 ± 2,5	> 300
ιOT	44,7 ± 0,7	52,8 ± 0,2	60,8 ± 0,6	64,0 ± 1,3	70,3 ± 1,1	85,3 ± 0,8	89,4 ± 1,3

TABELA 6 – TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO (aPTT) DAS FRAÇÕES κN, κOP, κOT, ι/νN, ι/νOT, ιN, ιOT, λN, λOP, λOT, θN, θOP E θOT.

(conclusão)

Amostra	aPTT (s)								
	Concentração polissacarídica (µg/mL) ^a								
	1	2	3	5	6	7	10	15	20
λN	38,1 ± 1,1	--	--	90,7 ± 3,4	--	--	165,8 ± 8,0	234,1 ± 1,9	256,6 ± 3,6
λOP	32,1 ± 0,2	50,8 ± 0,3	156,3 ± 4,2	171,0 ± 5,8	200,0 ± 5,7	> 300	> 300	> 300	> 300
λOT	36,1 ± 0,4	--	71,5 ± 0,8	103,2 ± 6,4	204,9 ± 2,1	284,3 ± 2,7	> 300	> 300	> 300

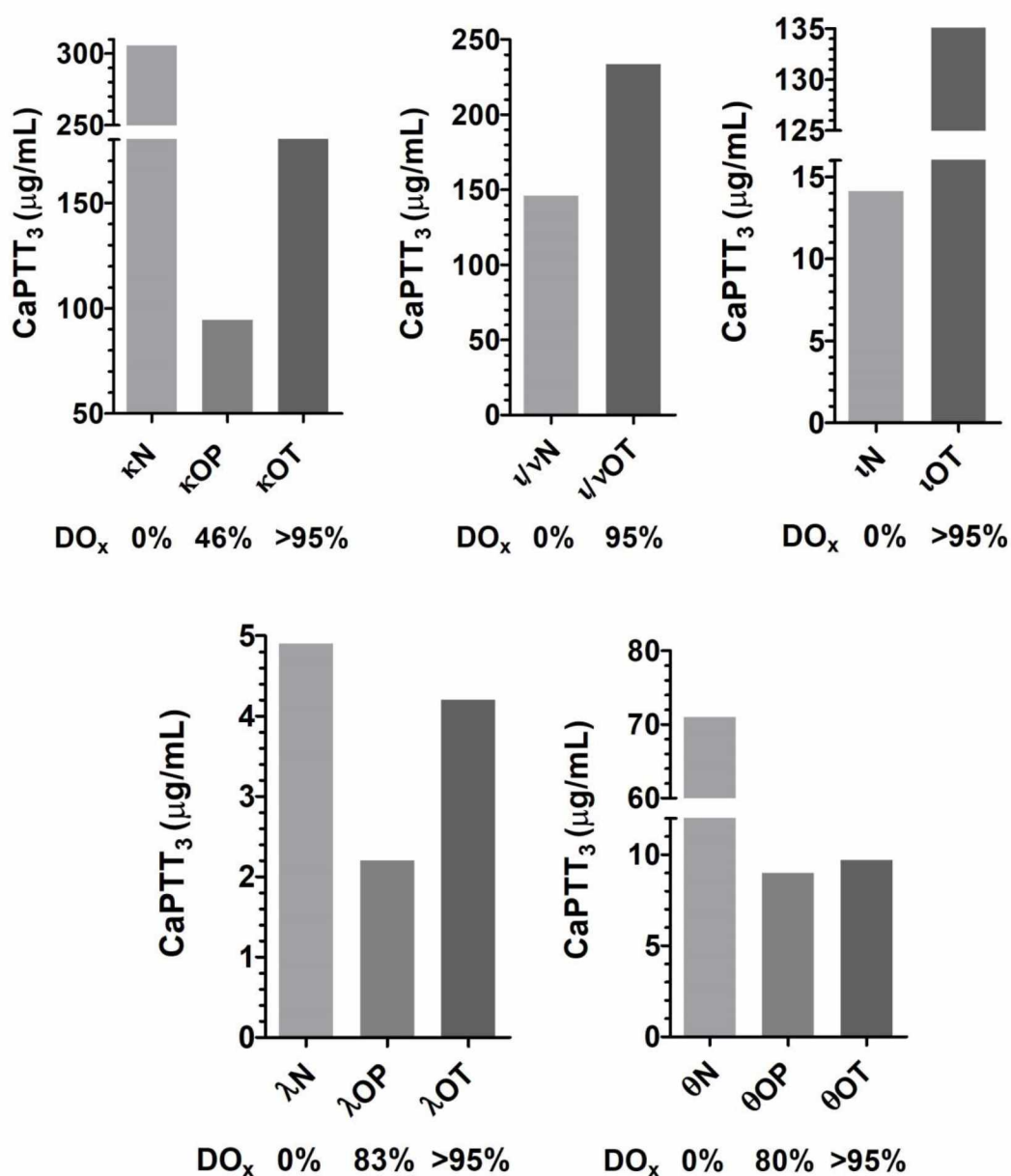
Amostra	aPTT (s)						
	Concentração polissacarídica (µg/mL) ^a						
	10	20	30	40	50	100	150
θN	44,0 ± 0,8	52,1 ± 3,9	62,9 ± 4,6	67,0 ± 3,5	82,0 ± 0,7	100,3 ± 3,8	117,0 ± 1,8
θOP	99,0 ± 0,6	138,7 ± 2,2	162,7 ± 9,2	181,3 ± 9,7	222,1 ± 2,9	> 300	> 300
θOT	92,4 ± 3,0	128,9 ± 4,7	150,4 ± 3,1	188,3 ± 5,7	237,0 ± 11,1	> 300	> 300

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: ^aResultados são expressos como tempos médios ± desvio padrão da média. Solução salina (29,5 ± 0,4 aPTT) utilizada como controle negativo e como controle positivo heparina não-fractionada (200,47 UI/mg), aPTT = 194,5 ± 1,1 na concentração de 10 µg/mL

Todas as amostras mostraram um aumento do tempo de aPTT dependente da dose (TABELA 6). Assim, a fim de comparar a atividade entre todas as amostras testadas, foi calculada a concentração requerida para triplicar o tempo de coagulação do plasma na presença da solução salina (CaPTT₃) (FIGURA 15). Dessa forma, quanto maior o valor de CaPTT₃ menor a atividade anticoagulante do polissacarídeo.

FIGURA 15 - DEPENDÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRA NECESSÁRIA PARA TRIPLICAR O APTT DA SOLUÇÃO SALINA (CaPTT₃) EM FUNÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO (DO_x).



FONTE: O autor (2019).

A comparação das amostras nativas (κ N, ι /vN, ι N, λ N e θ N) indicou que λ N, a carragenana mais sulfatada, foi a fração mais potente, seguida por ι N, θ N, ι /vN e κ N. Estes resultados foram similares ao reportado para a atividade anticoagulante *in vitro* de carragenanas contendo o mesmo padrão de sulfatação (ARAÚJO et al., 2013).

É importante salientar que a fração ι /vN, a qual apresenta díades di- e trissulfatadas, mostrou uma menor atividade anticoagulante quando comparada com as carragenanas constituídas por díades dissulfatadas, como ι N e θ N, mostrando que o DS não é o fator mais importante. Assim, embora o polissacarídeo mais sulfatado (λ N) apresentou a melhor atividade, estes resultados sugerem que a regioquímica de grupos sulfato é importante na cadeia polissacarídica. A amostra ι N mostrou melhor atividade do que θ N, sugerindo que para as carragenanas nativas a sulfatação em C4 das unidades β -D-Galp é mais relevante para o efeito anticoagulante do que a sulfatação em C2.

Biopolímeros contendo ácido galacturônico, como a pectina, não apresentam atividade anticoagulante significativa. No entanto, a sulfatação química desses polissacarídeos pode aumentar o efeito biológico, sugerindo que grupos sulfato são mais importantes do que grupos carboxílicos para a atividade anticoagulante (BAE et al., 2009; FAN et al., 2012; MAAS et al., 2012). Contudo, é complexo avaliar o efeito sinérgico entre os grupos sulfato e carboxil, pois isso requer a comparação de polissacarídeos sulfatados contendo similar padrão de sulfatação a fim de evitar uma errônea interpretação devido ao maior efeito anticoagulante dos grupos sulfato. Neste trabalho, as carragenanas nativas e os derivados oxidados obtidos mostraram conteúdo de sulfato similar e dessa forma, permitiu a avaliação desse efeito.

A comparação das carragenanas oxidadas com maiores graus de oxidação, κ OT, λ OT e θ OT, com suas frações nativas, κ N, λ N e θ N, indicou que a conversão das unidades β -D-Galp em seus derivados de ácidos urônicos aumentou a atividade anticoagulante. As exceções foram ι OT e ι /vOT, que mostraram menores atividades do que as amostras nativas ι N e ι /vN, respectivamente.

Em relação ao padrão de sulfatação das carragenanas oxidadas, θ OT mostrou maior atividade do que ι OT e ι /vOT sugerindo que a sulfatação em C2 das unidades β -D-Galp tem um efeito benéfico maior na propriedade anticoagulante do que a substituição em C4 da mesma unidade. Recentemente, foi reportado que diferenças no padrão de sulfatação de oligossacarídeos sintéticos contendo ácidos

urônicos C2-sulfatado são importantes para ligar especificamente o cofator II da heparina, mas não a antitrombina (SANKARANARAYANAN et al., 2017).

Juntos, esses dados sugerem que o efeito sinérgico de grupos carboxílicos na atividade anticoagulante de carragenanas nativas e oxidadas é dependente da regioquímica dos grupos sulfato na estrutura polissacarídica.

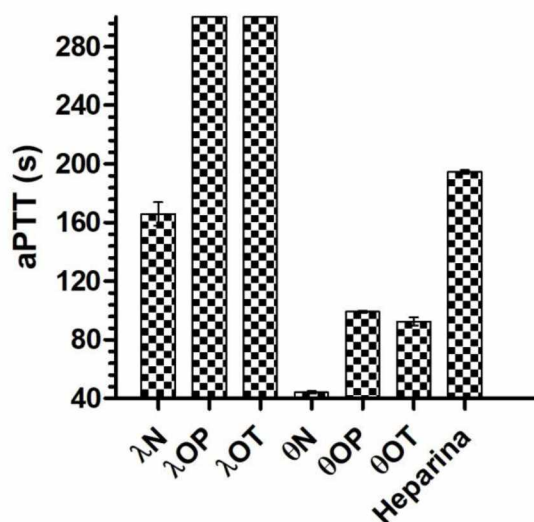
Ainda, é importante notar que κ OP (DOx=46%) mostrou maior atividade do que o polissacarídeo totalmente oxidado κ OT (DOx > 95%), indicando que a completa oxidação das unidades β -D-Galp não necessariamente produz o melhor efeito biológico. Portanto, o aumento na densidade de carga promovida pelos grupos carboxílicos não é a principal característica para explicar a maior atividade anticoagulante dos derivados oxidados de κ -carragenana.

No trabalho de Cosenza e colaboradores (2015), os derivados oxidados de κ -carragenana com oxidação parcial apresentaram atividade antiviral contra os vírus HSV-1 e HSV-2 maior em relação à total introdução de grupos carboxílicos em C6. Embora alguns efeitos de massa molecular não possam ser descartados, os autores atribuem esse fato a fatores conformacionais originados em interações não relacionadas (iônicas, dipolares ou van der Waals) que facilitam ou interrompem a interação dos polissacarídeos com o vírus (COSENZA et al., 2015).

Forget et al. (2013) relatou que a oxidação com TEMPO na agarose e κ -carragenana alterou as estruturas secundárias desses polissacarídeos de hélice para folhas β . Assim, alterações conformacionais induzidas pela oxidação parcial das unidades β -D-Galp em κ OP pode ser uma das razões para explicar o melhor efeito anticoagulante.

Em relação ao efeito anticoagulante mais potente, se destacaram as amostras λ N, λ OP, λ OT, θ OP e θ OT, as quais mostraram atividade na concentração de 10 μ g/mL próxima à heparina (FIGURA 16).

FIGURA 16 - ATIVIDADE DE LAMBDA- E THETA-CARRAGENANAS NATIVAS E OXIDADAS



FONTE: O autor (2019).

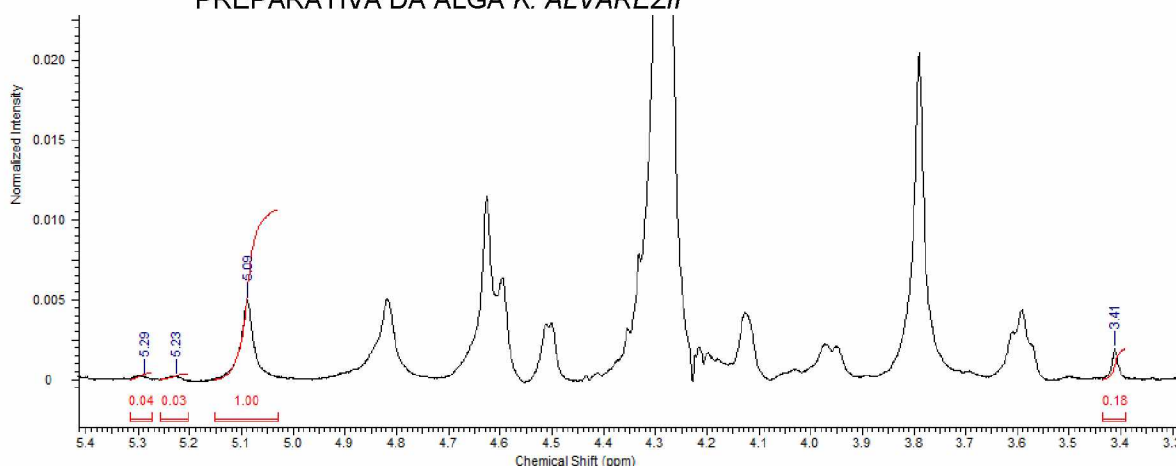
As amostras λPO e λTO, nessa mesma concentração, apresentaram valores superiores ao padrão de heparina na concentração de 10 µg/mL. É importante dizer que a oxidação de *theta*-carragenana (θN) aumentou sete vezes o CaPTT3 das amostras θOP e θOT. Juntos, esses resultados sugerem que os derivados oxidados de *lambda*- e *theta*-carragenanas são bons candidatos para maiores investigações de seus potenciais como anticoagulantes.

4.2 EFEITO DA OXIDAÇÃO SELETIVA C6 NAS PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS DE *KAPPA-CARRAGENANA*

4.2.1 Origem e extração da κ -carragenana (Amostra K)

A alga *Kappaphycus alvarezii* foi lavada, seca e moída. O extrato obtido após extração aquosa apresentou 38 % de rendimento e foi dialisado contra NaCl 0,2 mol/L e água deionizada. Em seguida foi liofilizado (fração K) e analisado por RMN de ^1H (FIGURA 17) visando comprovar a presença de κ -carragenana.

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO K OBTIDA A PARTIR DA EXTRAÇÃO PREPARATIVA DA ALGA *K. ALVAREZII*



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Solvente: D_2O , 70 °C, 400 Mhz. Acetona como padrão interno. ($\delta = 2,208$ ppm).

Através da análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 17) foi possível quantificar o teor de κ -carragenana, assim como identificar a presença minoritária de outros tipos de carragenanas que podem ser biossintetizadas por essa espécie de alga (MATULEWICZ et al., 1989; USOV, 1984). Para isso, foram integrados todos os sinais α -anoméricos das unidades 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose e α -D-galactopiranosose.

O espectro de RMN ^1H apresentou κ - (93%), ι - (4%) e μ -carragenana (3%) indicadas pela presença dos sinais α -anoméricos 5,09 ppm correspondente a unidade 3,6-anidro- α -D-galactopirose da κ -carragenana; 5,29 ppm que corresponde a unidade 3,6-anidro- α -D-galactopirose-2-sulfato da ι -carragenana e 5,23 ppm correspondente a unidade α -D-galactopirose-6-sulfato de μ -carragenana (USOV; YAROTSKI; SHASHKOV, 1980; VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004).

Como a quantidade de ι -carragenana era muito pequena em relação a quantidade de κ -, a purificação com cloreto de potássio (KCl) para precipitação da fração contendo principalmente κ -carragenana (MATULEWICZ et al., 1989), foi desnecessária.

Também foi observada a presença de unidades 6-O-metil- β -D-galactopiranosose-4-sulfato indicadas pelo sinal em 3,41 ppm (ESTEVEZ; CIANCIA; CERESO, 2004), que podem estar ligadas na κ - ou na ι -carragenana.

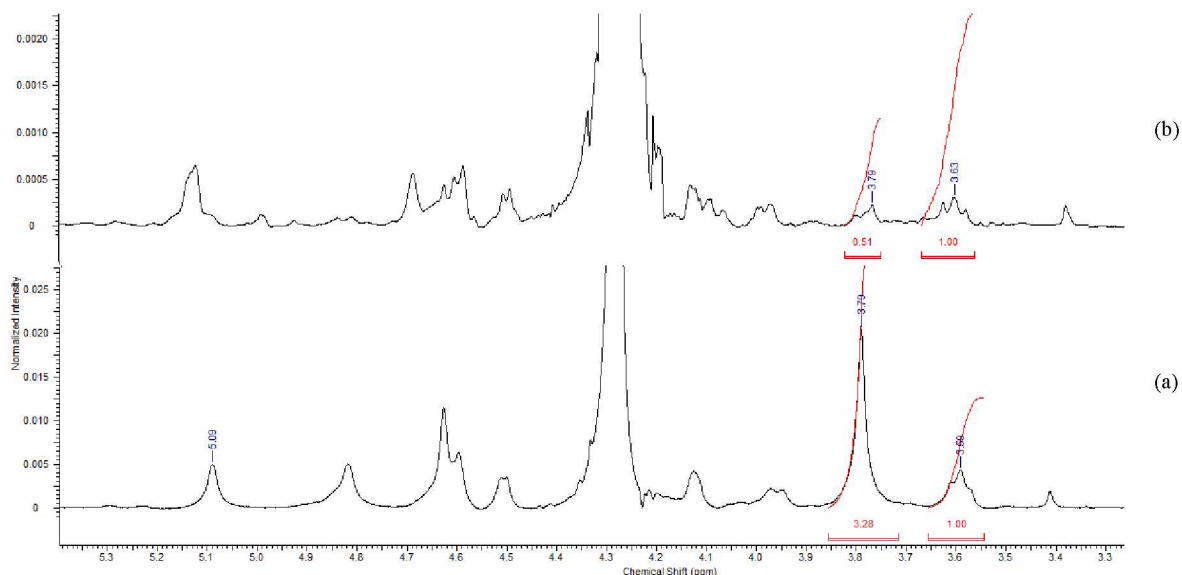
4.2.2 Redução e oxidação seletiva da amostra K

A redução da fração K com NaBH_4 para redução dos terminais redutores dos polissacarídeos (ASPINALL, 1982) gerou a fração KR (FIGURA 18b) com rendimento de 87%.

Foi realizada a reação de oxidação seletiva com 8 g de KR rendendo 88% de KOx (7,0 g). A reação foi confirmada através do método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) que indicou 31 % em teor de ácido urônico.

No espectro de RMN de ^1H de KOx e KR da FIGURA 18 observou-se a diminuição no sinal em 3,79 ppm correspondente aos hidrogênios H6, H6' e H5 da unidade de β -D-galactopiranosose-4-sulfato no espectro de KOx (USOV; SHASHKOV, 1985; VAN DE VELDE et al., 2002, VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004), indicando que a oxidação em C6 da unidade β -D-galactopiranosose ocorreu. A quantificação foi realizada utilizando a Equação 1, que indicou um grau de 84% de oxidação em C6 da unidade β -D-galactopiranosose-4-sulfato na fração KOx.

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO KR (a) E KOx (b).



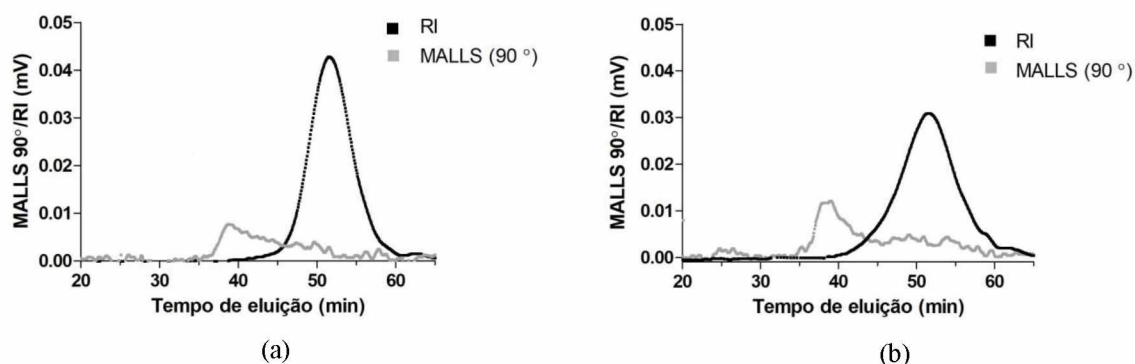
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Solvente: D_2O , 70 °C, 400 MHz.

4.2.3 Análise de homogeneidade por HPSEC-RI/MALLS

As análises de homogeneidade das frações K e KOx foram realizadas no HPSEC-RI/MALLS. Os perfis de eluição estão apresentados na FIGURA 19.

FIGURA 19 - PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) (--) E ESPALHAMENTO DE LUZ LASER EM MULTIÂNGULOS (MALLS) (--) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN) DAS FRAÇÕES K (a) E KO (b).



FONTE: O autor (2019).

De acordo com o perfil de eluição apresentado na FIGURA 19, foi possível visualizar através do detector de MALLS picos em aproximadamente 38 min, que sugerem polímeros de alta massa molar. Estes picos estão sem sinal para o detector de RI o que demonstra que as moléculas de alta massa molar possuem baixas

concentrações nas amostras analisadas. Nos tempos 51,5 (FIGURA 19a) e 51,8 (FIGURA 19b) min, condizentes com o índices de refração, foi observado picos únicos sugerindo amostras homogêneas, de baixa massa, onde inexistia sinal para o detector MALLS. Tendo em vista a ausência de sinal para MALLS, foi estimado as massas molares relativas a partir da curva padrão com dextrana ($9 \cdot 10^3$ a $2000 \cdot 10^3$ g/mol).

Por meio de regressão linear, utilizando a equação da reta da curva de dextrana ($y = -0,1741x + 13,237$ e $R^2 = 0,9879$) e os tempos de retenção das amostras analisadas (51,5 e 51,8 min), obteve-se as seguintes estimativas de massas molares relativas: 18.657 g/mol (K – κ -carragenana nativa) e 18.068 g/mol (KOx- κ -carragenana C6 oxidada).

4.2.4 Análise elementar

As propriedades físico-químicas dos géis de polietrólitos, entre elas a κ -carragenana, são notoriamente afetadas pela presença de íons, que pode variar pela espécie de alga utilizada e por processos de extração (laboratoriais ou comerciais) (NILSSON; PICULLEL; JOÈNSSON, 1989; HERMANSSON; ERIKSSON; JORDANSSON, 1991; CHEN; LIAO; DUNSTAN, 2002; WANG et al., 2018; BUI et al., 2019a; BUI et al., 2019b; GEONZON; BACABAC; MATSUKAWA, 2019). Assim, foi realizada a determinação de elementos iônicos por espectrometria de absorção atômica por chama das amostras K e KOx, antes da adição de KCl.

Para a amostra K, foram determinados os conteúdos de Na^+ e K^+ , sendo estes 3,8 % (w/w) (38,1 mg/g) e 0,004 % (w/w) (0,04 mg/g), respectivamente. O resultado está de acordo com o reportado por Bui et al. (2019a) que relatou o valor de 41,5 mg/g para o íon Na^+ . O íon K^+ não foi observado. Nesse estudo, κ -carragenana foi extraída com água a partir de *Kappaphycus alvarezii* e diálise contra 0,1 mol/L de NaCl, o mesmo procedimento realizado neste trabalho. Para KOx os valores de Na^+ e K^+ foram 5,6 % (w/w) (56,0 mg/L) e 0,004 % (w/w) (0,04 mg/L), onde o aumento na porcentagem de Na^+ pode ser atribuído a carboxilação da estrutura, pois o sódio também interage com a carboxila como um contra-íon.

4.2.5 Análises reológicas oscilatórias

As análises reológicas dinâmicas oscilatórias foram realizadas com o intuito de avaliar de maneira inédita o efeito de grupos carboxilas na estrutura da κ -carragenana. Como o K^+ é o principal indutor da gelificação de κ -carragenana, ele foi adicionado nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mol/L na carragenana nativa e C6 oxidada. Embora a κ -carragenana nativa na presença do K^+ seja bem explorada na literatura, a maioria dos trabalhos abordam concentrações até 0,1 mol/L (STADING; HERMANSSON, 1993; COSENZA et al., 2014; ROBAL et al., 2017; WANG et al., 2018; BUI et al., 2019a). Assim, neste trabalho foi avaliado o efeito da κ -carragenana na concentração de 0,1 mol/L, e em concentrações mais altas, 0,5 mol/L e 1 mol/L.

Para isso, foram preparadas soluções de κ -carragenana e κ -carragenana oxidada nas concentrações de 10 g/L na ausência e presença de K^+ nas concentrações 0,1, 0,5 e 1,0 mol/L (FIGURA 20).

As amostras obtidas a partir de κ -carragenana (K, K-0,1K, K-0,5K, K-1K) e da κ -carragenana oxidada (KOx, KOx-0,1K, KOx-0,5K, KOx-1K) foram analisadas inicialmente por uma varredura de tensão (FIGURA 20) visando a determinação da região viscoelástica linear dos sistemas (RVL) e a escolha de uma tensão para análise da varredura de frequência.

FIGURA 20 - VARREDURAS DE TENSÃO EXECUTADAS EM MODO CS DE 0,02 – 10 Pa PARA AS AMOSTRAS K E KOx EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE K^+

(continua)

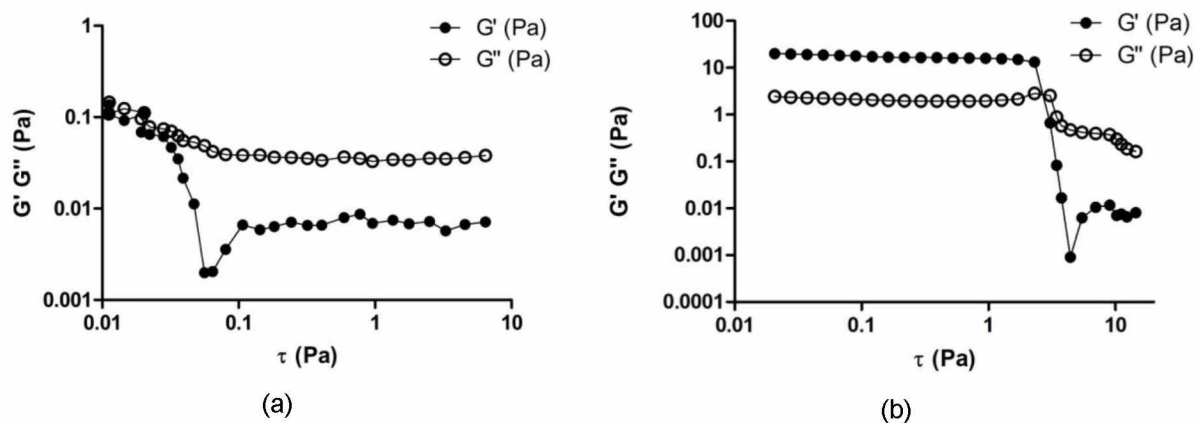
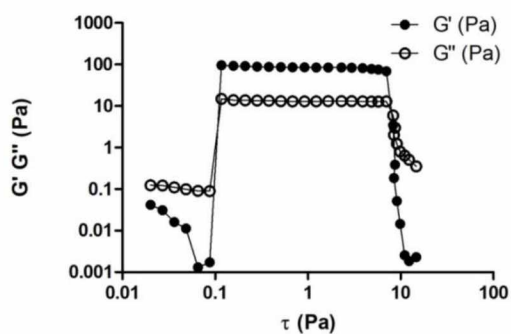
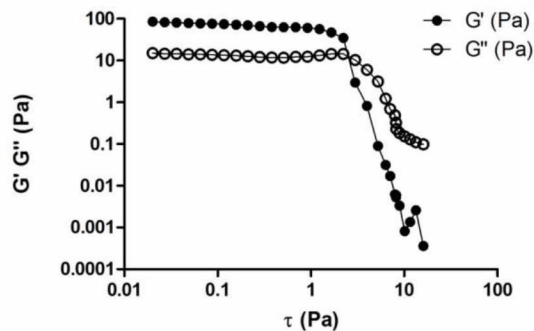


FIGURA 20 - VARREDURAS DE TENSÃO EXECUTADAS EM MODO CS DE 0,02 – 10 Pa PARA AS AMOSTRAS K E KOx EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE K^+

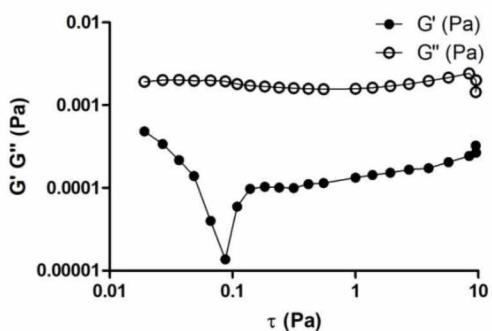
(conclusão)



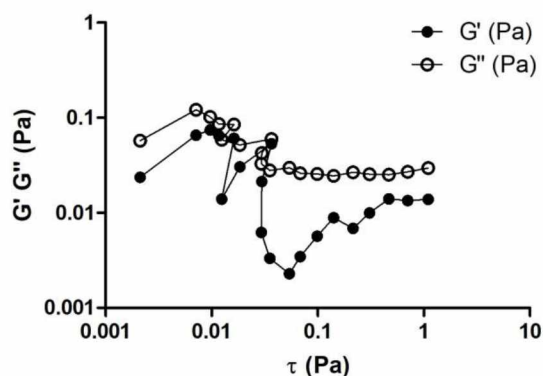
(c)



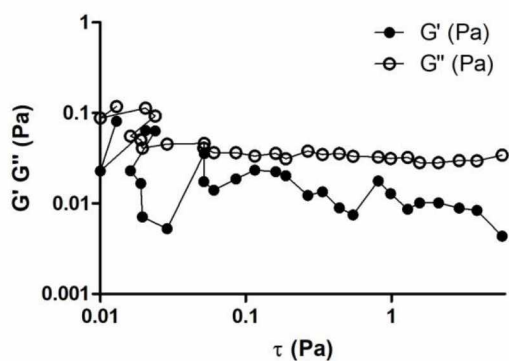
(d)



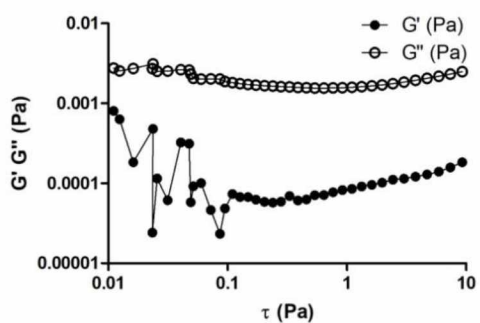
(e)



(f)



(g)



(h)

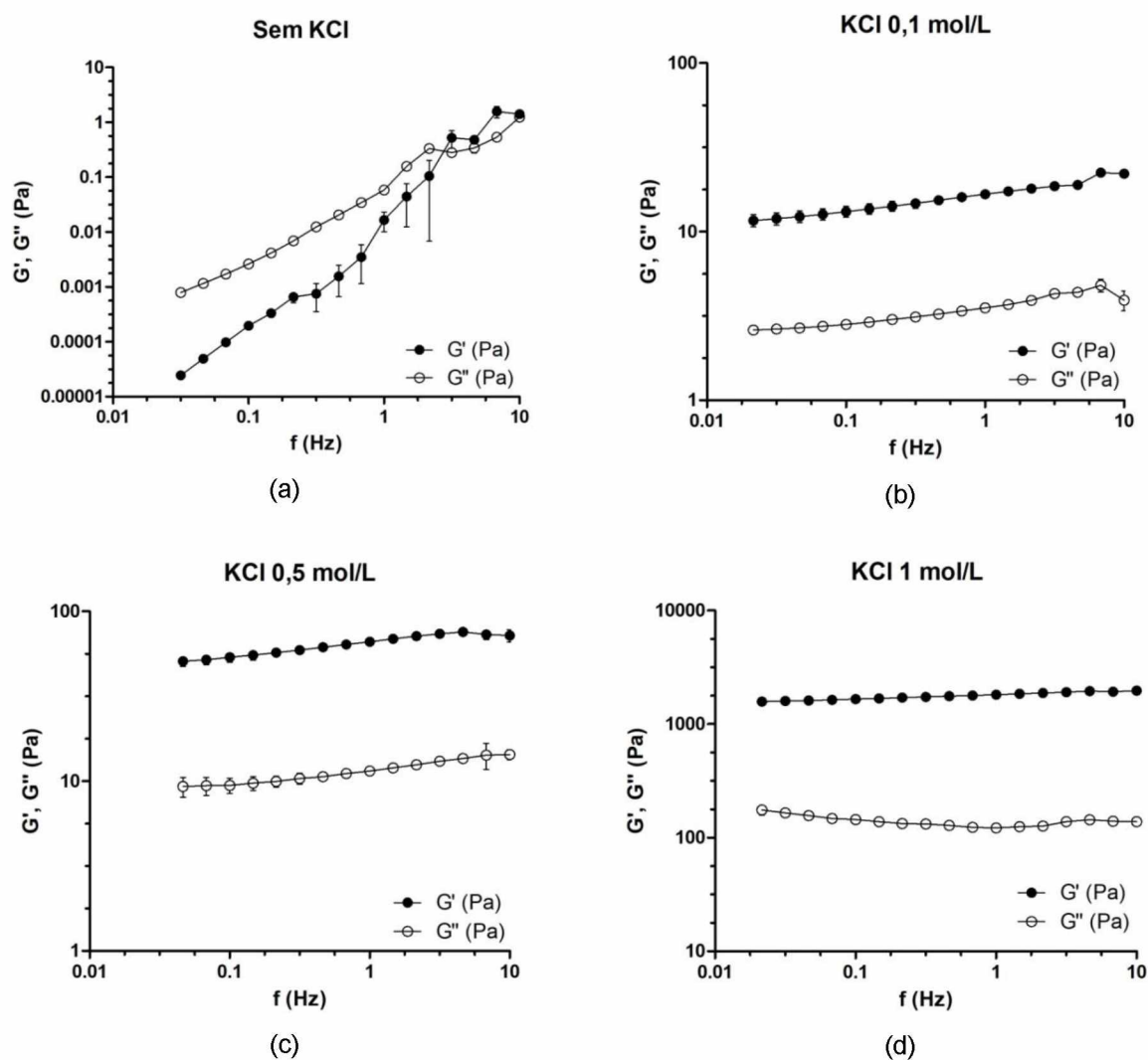
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Varredura de tensão com frequência constante de 1,0 Hz realizados na temperatura de 20 °C. Os gráficos referem-se as amostras a) K; b) K na presença de 0,1 mol/L de KCl; c) K na presença de 0,5 mol/L de KCl; d) K na presença de 1 mol/L de KCl; e) KOx; f) KOx na presença de 0,1 mol/L de KCl; g) KOx na presença de 0,5 mol/L de KCl; h) KOx na presença de 1 mol/L de KCl.

A FIGURA 20 demonstra que as amostras que apresentaram RVL a partir dos valores de G' e G'' estáveis e em ordem decrescente foram K-1K, K-0,5K, K-0,1K, KOx e KOx-1K. Apenas as amostras K-1K, K-0,5K e K-0,1K apresentaram valores de $G' > G''$ em toda faixa de frequência estudada.

A partir das varreduras de tensão (FIGURA 20) foram escolhidas as tensões de 0,1 ou 1 Pa para a análise de varredura de frequência das amostras obtidas a partir de κ -carragenana, K, K-0,1K, K-0,5K e K-1K) e varredura de temperatura. A FIGURA 21 apresenta as varreduras de frequência das amostras K, K-0,1K e K-0,5K.

FIGURA 21 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS K, K-0,1K, K-0,5K E K-1K



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Varreduras de frequência realizadas em modo CS, na temperatura fixa de 20°C e tensão constante de 1,0 Pa. Faixa de frequência varrida de 0,02 a 10 Hz. Os gráficos referem-se as amostras (a) K sem adição de KCl; (b) K na presença de 0,1 mol/L de KCl; (c) K na presença de 0,5 mol/L de KCl e (d) K na presença de 1 mol/L de KCl.

Na FIGURA 21, sem a adição de KCl G'' é superior a G' em toda a faixa de frequência analisada (0,05 a 1 Hz), indicando comportamento de líquido. Com a adição de K^+ nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mol/L, as varreduras de frequência apresentaram $G' > G''$ caracterizando o comportamento de gel.

Comparando os valores de G' na frequência de 1 Hz para K-0,1K (16,7 Pa) (TABELA 7) e para a solução de κ -carragenana sem a adição do cátion (K) (0,0166 Pa), pode-se observar um aumento de 99,9% na formação do gel. Em relação a K-0,5K (66,2 Pa), esta é 75% maior que a amostra K-0,1K. Para K-1K, $G' = 1820$ Pa mostrando que quanto maior a concentração de K^+ adicionado, maior foi o valor de G' obtido.

Com a finalidade de avaliar a estabilidade das amostras frente a variação de temperatura foram realizadas rampas de temperatura, inicialmente com a κ -carragenana (K) na concentração de 10 g/L sem e com a adição de KCl nas concentrações de 0,1, 0,5, e 1 mol/L (FIGURA 22).

FIGURA 22 - G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DA FRAÇÃO K.

(continua)

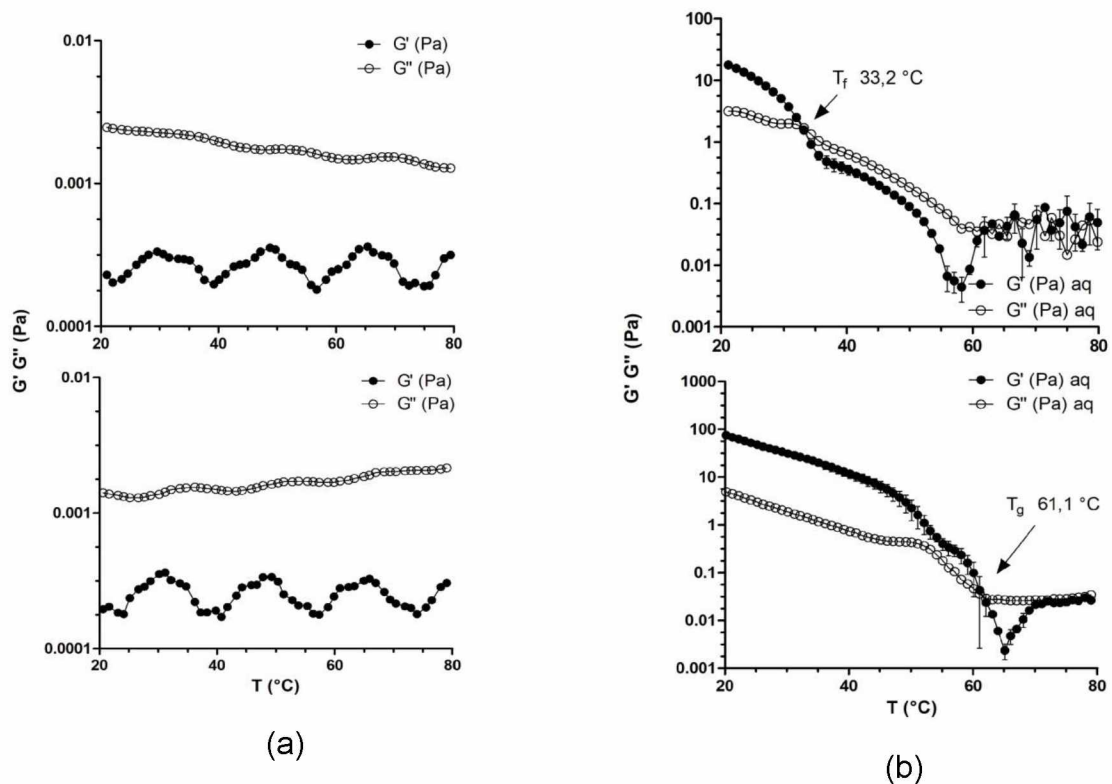
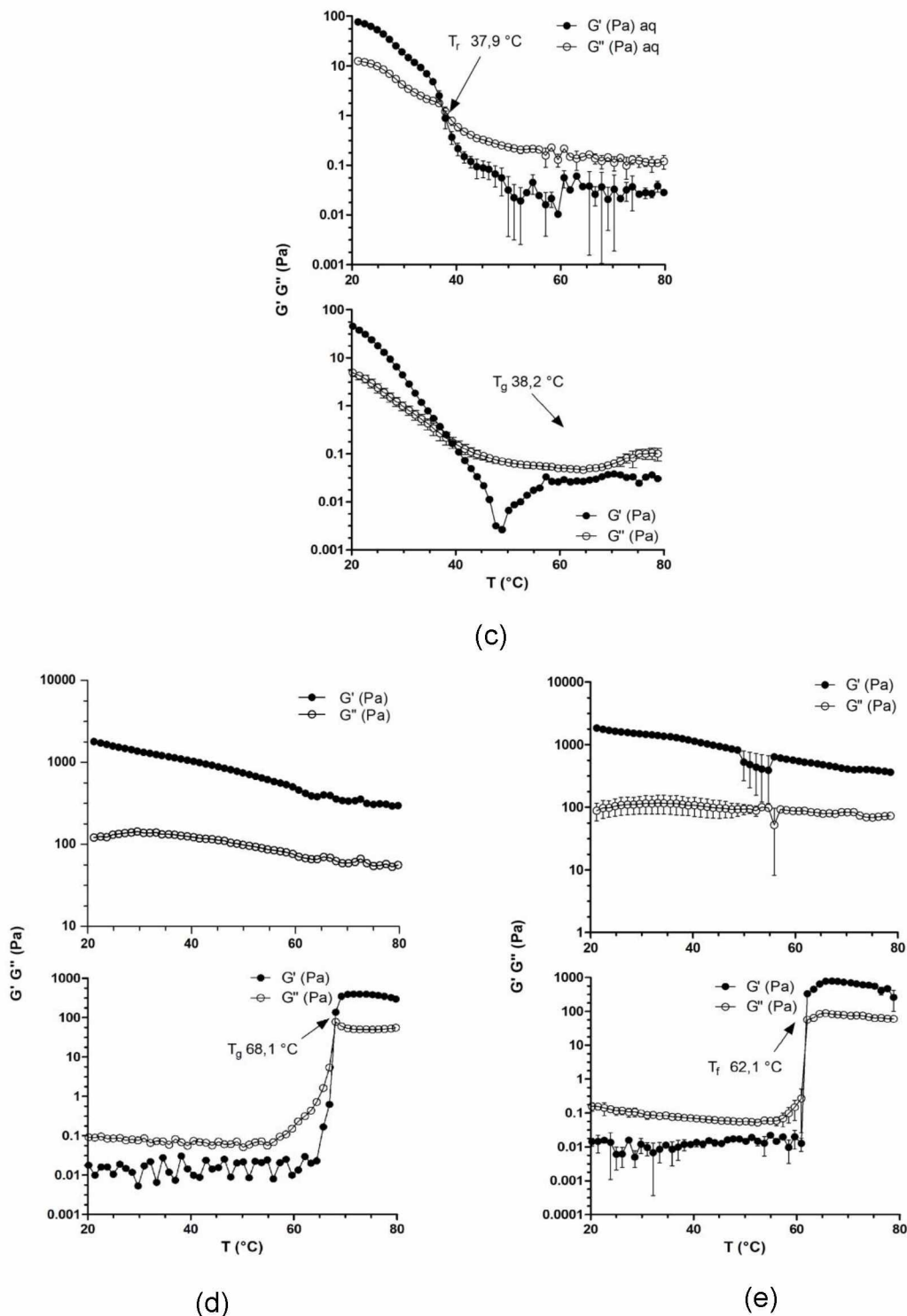


FIGURA 22 - G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DA FRAÇÃO K.

(conclusão)



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Rampa de temperatura realizada em modo CS. Aquecimento de 20 °C a 80 °C a uma taxa de 1°C/min (fig. superior) e resfriamento de 80 °C até 20 °C na mesma taxa (fig. inferior). Os gráficos referem-se as amostras (a) K sem KCl, com frequência fixa de 0,1 Hz, e tensão constante de 1,0 Pa; (b) K na presença de KCl 0,1 mol/L, com frequência fixa de 1,0 Hz e tensão constante de 1,0 Pa; (c) K na presença de KCl 0,5 mol/L, com frequência fixa de 1,0 Hz e tensão constante de 0,1 Pa e (d) K na presença de KCl 1,0 mol/L, com frequência fixa de 1,0 Hz e tensão constante de 1,0 Pa.

Na FIGURA 22a, é apresentado o experimento realizado com a κ -carragenana (K) sem cloreto de potássio. Observa-se que em nenhum momento durante o aquecimento ou o resfriamento houve a gelificação da amostra K, pois G'' se manteve maior que G' em toda a faixa de temperatura analisada.

Visando avaliar o efeito da presença de K^+ nas soluções de carragenana, foi preparada uma solução de κ -carragenana com 0,1 mol/L de potássio (K-0,1K) e realizada uma rampa de temperatura (FIGURA 22b). Neste caso, observa-se que na faixa de 20 a 30 °C, no aquecimento, G' é superior a G'' caracterizando um comportamento de gel. Na temperatura de 33,2 °C, $G'=G''$ denominado de ponto de fusão. A partir deste ponto ocorre a inversão dos módulos passando $G'' > G'$, resultando em um caráter líquido da amostra. A partir de 60°C, é observado instabilidade dos módulos.

No resfriamento (FIGURA 22b, inferior da figura), observa-se que $G'' > G'$ na faixa de 80 a 60 °C, caracterizando um comportamento de líquido, mas ambos aumentam com a diminuição da temperatura. O gel começa a se formar na temperatura de 61,1 °C, onde $G'=G''$ denominado de ponto de gelificação. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Hermansson, Eriksson e Jordansson (1991) no valor de 54-52 °C e por Wang et al. (2018), no valor de 55°C, ambos experimentos realizados na mesma concentração (TABELA 7).

Para a solução de κ -carragenana acrescida de KCl na concentração de 0,5 mol/L (K-0,5K) (FIGURA 22c) o ponto de fusão da amostra ocorreu em 37,9 °C. A faixa de instabilidade dos valores de G' e G'' observada na FIGURA 22b a partir de 60 °C para KCl 0,1 mol/L não foi observada aqui. Durante o resfriamento (FIGURA 22c, inferior da figura), $G'' > G'$ e ambos aumentaram com a diminuição da temperatura. O ponto de gelificação ocorreu na temperatura de 38,2 °C, sendo menor que a T_g para a amostra K-0,1K. Até que se tenha conhecimento, este dado nunca foi reportado na literatura.

Wang e colaboradores (2018) estudaram a influência da concentração de K^+ na gelificação de κ -carragenana na concentração de 10 g/L, porém em concentrações entre 0 a 0,1 mol/L. Eles observaram uma correlação positiva entre a concentração e a temperatura de gelificação, onde a força do gel aumentou com o aumento da concentração do sal. Observando a curva com os valores relatados por Wang et al. (2018) e os valores encontrados nesse trabalho (ANEXO 2), é possível notar que os valores de T_g para a κ -carragenana com 0,1 mol/L de KCl são

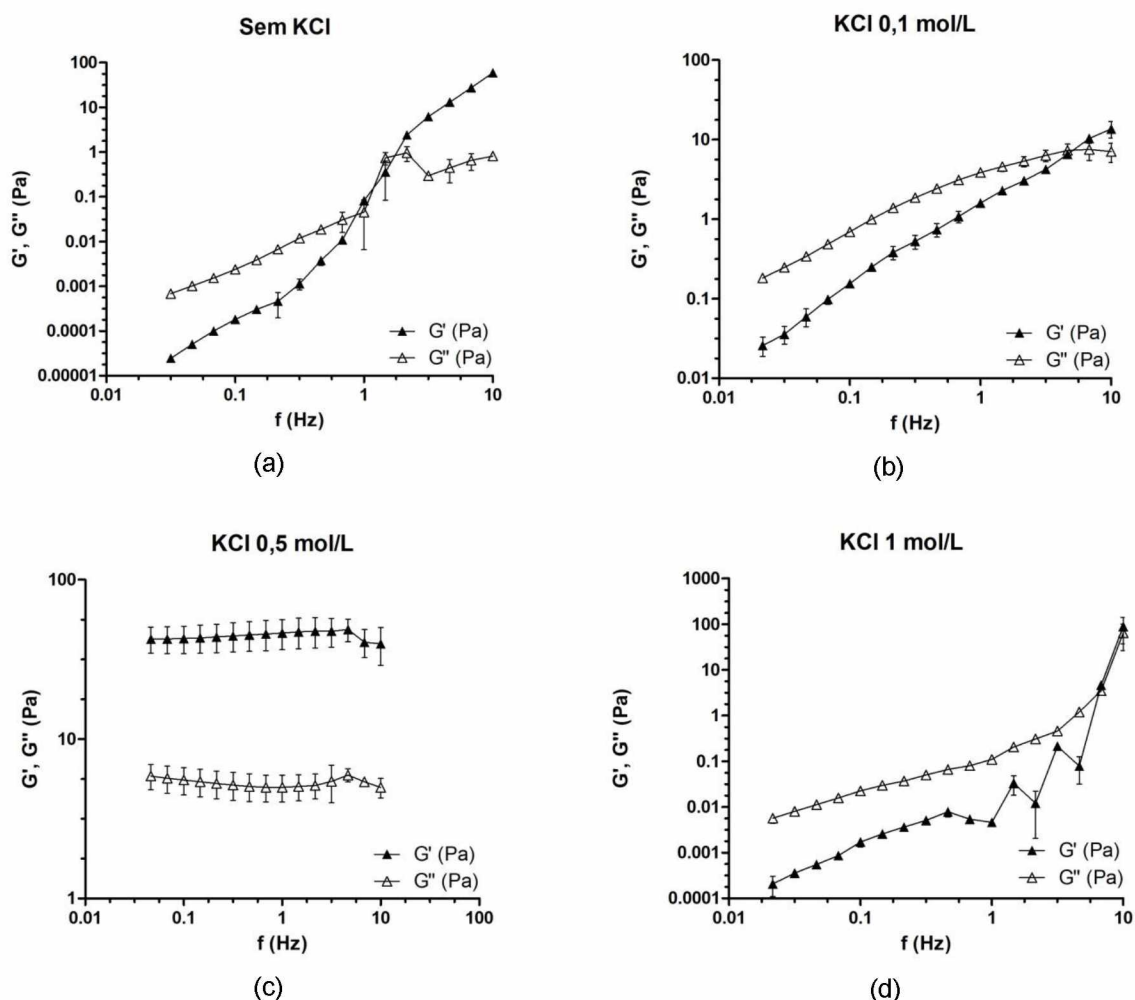
próximos, 55 °C e 57,6 °C, respectivamente. Porém, com o aumento da concentração iônica para 0,5 mol/L, a temperatura de gelificação diminuiu.

Tipicamente, os géis de κ -carragenana podem sofrer a exudação de água (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Como estão sendo utilizadas altas concentrações de K^+ , a diminuição na temperatura de gelificação pode estar sendo causada pela sinerese.

Na FIGURA 22d, diferente das demais concentrações, K-1K apresentou estabilidade da estrutura de gel na faixa de temperatura de 20 a 80 °C, no aquecimento, ou seja, G' superior a G'' em toda a rampa, não sendo possível determinar a temperatura de fusão. Observou-se no resfriamento (FIGURA 22d), uma temperatura de transição de gel para solução em 68,1 °C. Após a transição, o material apresentou-se permanentemente como um líquido viscoso. O mesmo efeito foi observado após a repetição da análise 48 h depois. O fato do material se liquificar após resfriar é inédito na literatura.

Foram realizadas varreduras de frequência após as rampas de temperatura para verificar se os sistemas haviam se alterado (FIGURA 23).

FIGURA 23 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAS K, K-0,1K, K-0,5K E K-1K APÓS RAMPAS DE TEMPERATURA



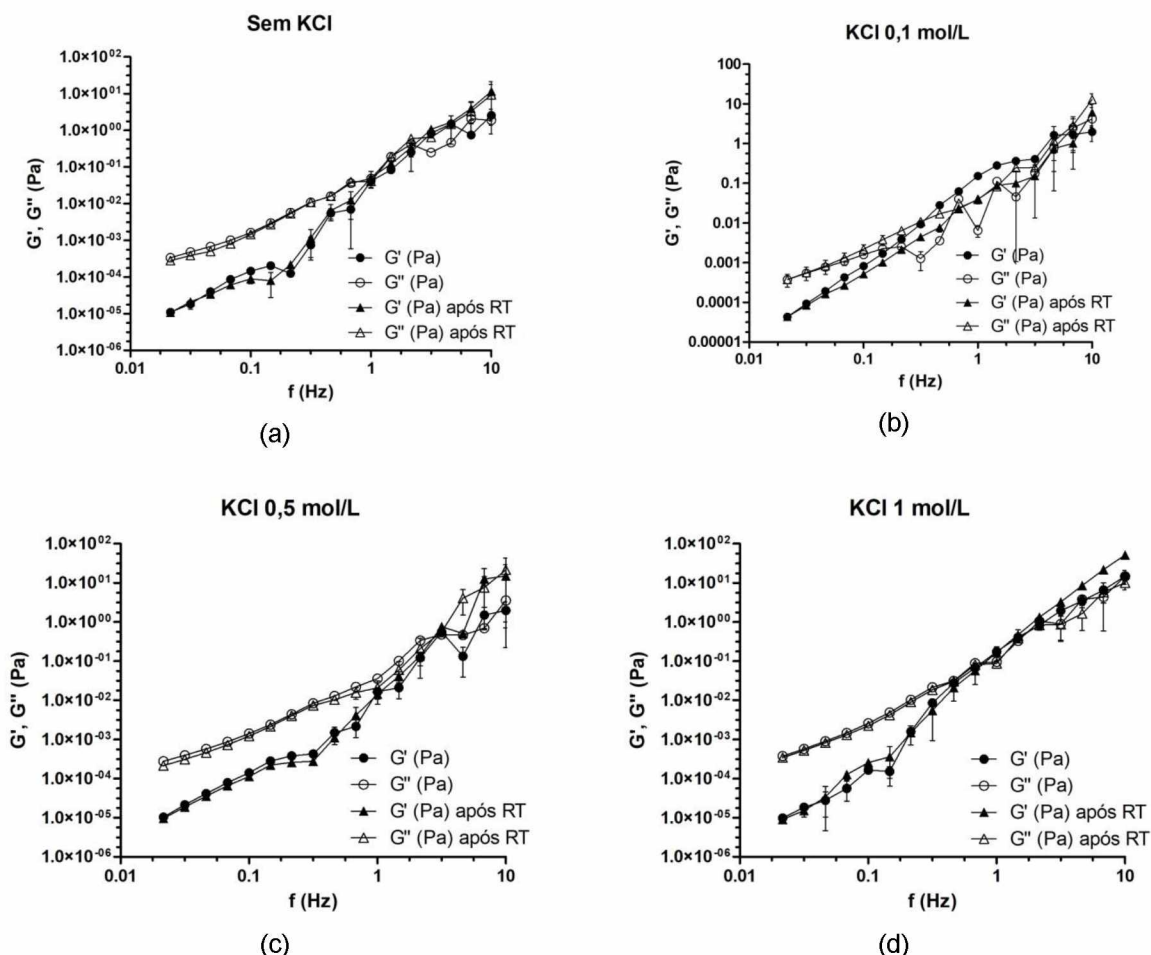
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Varredura de frequência realizada em modo CS, na temperatura fixa de 20°C e tensão constante de 1,0 Pa. Faixa de frequência varrida de 0,02 a 10 Hz. Os gráficos referem-se as amostras (a) K sem adição de KCl; (b) K na presença de 0,1 mol/L de KCl; (c) K na presença de 0,5 mol/L de KCl e (d) K na presença de 1 mol/L de KCl.

Após as rampas de temperatura, G'' passou a ser maior que G' , revertendo a condição de gel para fluido na faixa de frequência analisada. Este dado indica que a estrutura de rede da κ -carragenana formada previamente foi desestruturada quando submetida a temperatura máxima de 80 °C. A exceção foi para K-0,5K (FIGURA 23c), que apresentou G' superior ao G'' mesmo após a curva de resfriamento.

Realizados os experimentos reológicos com a κ -carragenana nativa (K), foram realizados os experimentos com a κ -carragenana C6 oxidada (KOx). Assim, na FIGURA 24 são apresentadas as varreduras de frequência para KOx antes e após as rampas de temperatura.

FIGURA 24 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA ANTES E APÓS AS RAMPAS DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS KOx, KOx-0,1K, KOx-0,5K E KOx-1K.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Varreduras de frequência realizadas em modo CS, na temperatura fixa de 20°C e tensão constante de 0,1 Pa. Faixa de frequência varrida de 0,02 a 10 Hz antes (●) e após rampas de temperatura (RT) (▲). Os gráficos referem-se as amostras (a) KOx sem adição de KCl; (b) KOx na presença de 0,1 mol/L de KCl; (c) KOx na presença de 0,5 mol/L de KCl e (d) KOx na presença de 1 mol/L de KCl.

Em geral, as varreduras de frequência da κ -carragenana C6 oxidada na ausência e presença de K^+ (KOx, KOx-0,1K, KOx-0,5K e KOx-1K) apresentaram comportamento semelhante as varreduras de frequência da κ -carragenana nativa (K) sem adição de KCl (FIGURAS 21a e 23a), onde $G'' > G'$ antes e após as rampas de temperatura, indicando comportamento de líquido viscoso. Assim, a presença das carboxilas na estrutura e o fato de ligarem mais K^+ não resultou em melhora na atividade gelificante do polissacarídeo.

A dependência de G' em relação a frequência indica a fragilidade do gel. De acordo com Necas e Bartosikova (2013), uma maior quantidade de grupos sulfato na carragenana propicia menor temperatura de fusão e menor força do gel. Nesse

caso, a presença da carboxila na molécula contribui com uma carga negativa que altera a estrutura tridimensional (FORGET et al., 2013) e provavelmente torna a estrutura mais instável.

TABELA 7 - PARÂMETROS REOLÓGICOS

Amostra	Tg ^a (°C)	Tf ^b (°C)	Valores dos módulos G' e G'' a 20°C na rampa de Temperatura				Valores dos módulos G' e G'' na frequência de 1Hz na varredura de Frequência					
			Aquecimento		Resfriamento		Antes da rampa de temperatura			Depois da rampa de temperatura		
			G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G'/G''	G' (Pa)	G'' (Pa)	G'/G''
K	n.o.	n.o.	0,0002	0,0025	0,0002	0,0014	0,0166	0,0581	0,2857	0,0823	0,0454	1,8128
K-0,1K	61,1	33,2	17,8200	3,1695	2,3600	2,3715	16,6950	3,5270	4,7335	1,5975	4,5875	0,3482
K-0,5K	38,2	37,9	76,5400	12,5400	45,4550	4,9205	66,2350	11,4750	5,7721	46,4050	4,9870	9,3052
K-1K	n.o.	68,1	1934	0,0002	0,0104	0,0830	1820	122,100	14,9058	0,0046	0,1099	0,0419
KOx	n.o.	n.o.	--	--	--	--	0,0414	0,0483	0,8571	0,0508	0,0403	1,2605
KOx-0,1K	n.o.	n.o.	--	--	--	--	0,1525	0,0064	23,8281	0,0396	0,0396	1,0000
KOx-0,5K	n.o.	n.o.	--	--	--	--	0,0165	0,0357	0,4622	0,0144	0,0594	0,2424
KOx-1K	n.o.	n.o.	--	--	--	--	0,1755	0,0956	1,8358	0,1145	0,1145	1,0000

FONTE: O autor (2019).

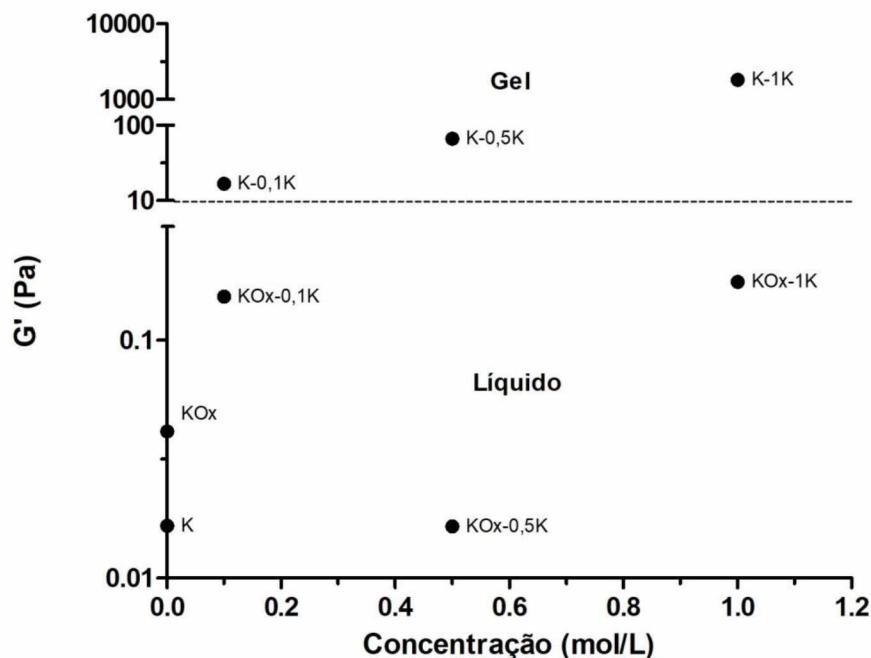
LEGENDAS:^aTemperatura de gelificação observada na rampa de resfriamento.

^bTemperatura de fusão observada na rampa de aquecimento.

n.o. = não observado.

A fim de comparar a força do gel de K e KOx, a FIGURA 25 apresenta os valores do módulo de armazenamento (G') em função das concentrações de K^+ adicionadas em K e KOx (TABELA 7).

FIGURA 25 - MÓDULO ELÁSTICO (G') EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE KCl.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: K = κ -carragenana; K-0,1K = κ -carragenana com 0,1 mol/L de KCl; K-0,5K = κ -carragenana com 0,5 mol/L de KCl; K-1K = κ -carragenana com 1 mol/L de KCl; KOx = κ -carragenana oxidada; KOx-0,1K = κ -carragenana oxidada com 0,1 mol/L de KCl; KOx-0,5K = κ -carragenana oxidada com 0,5 mol/L de KCl; KOx-1K = κ -carragenana oxidada com 1 mol/L de KCl.

NOTA: Valores de G' foram obtidos das varreduras de frequência das respectivas amostras. A fase gel corresponde as amostras que apresentaram comportamento de gel, ou seja, o módulo $G' > G''$ durante a varredura de frequência. A fase líquida corresponde as amostras que apresentaram comportamento de líquido, ou seja, módulos $G'' > G'$ durante a varredura de frequência.

As propriedades viscoelásticas de κ -carragenana oxidada (KOx) foram testadas com o intuito de avaliar o efeito da carboxila na estrutura polissacarídica. Como o cátion K^+ é o principal indutor na formação de gel para a κ -carragenana, ele foi adicionado em KOx. Quando analisada a força do gel de κ -carragenana oxidada (KOx), observou-se que na presença de KCl G' foi apenas 4x maior em relação a KOx sem adição de KCl, sofrendo menor influência da adição de K^+ do que a κ -carragenana nativa (K). KOx não formou gel em nenhuma das condições testadas.

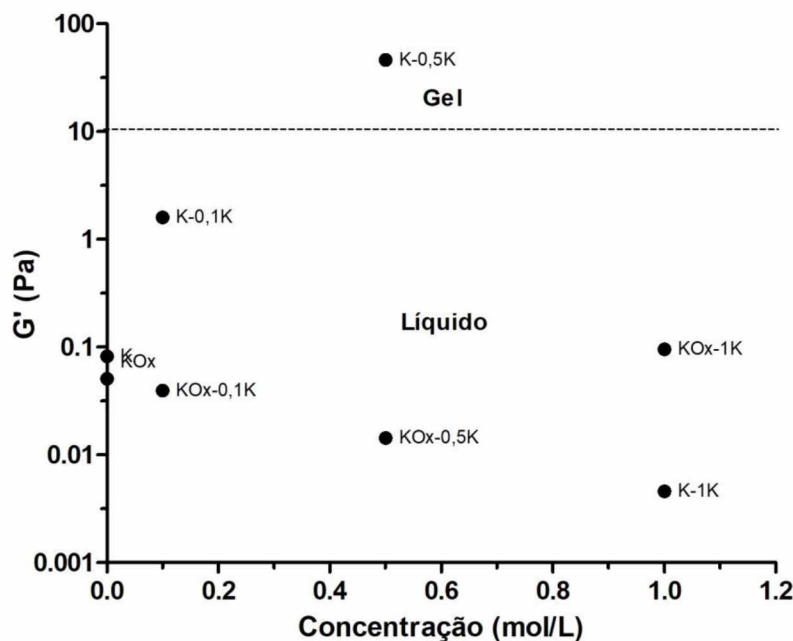
Para a carragenana nativa (K), na concentração de 0,1 mol/L de K^+ ocorreu o comportamento descrito na literatura (HERMANSSON; ERIKSSON;

JORDANSSON, 1991; WANG et al., 2018), onde sem a adição de KCl o comportamento é líquido e após sua adição, gelifica. No entanto, não existem, até que se tenha conhecimento, dados da gelificação de κ -carragenana em concentrações elevadas de 0,5 e 1 mol/L de KCl. Assim, neste trabalho, foi possível observar o aumento de força do gel G' quando se aumenta a concentração de KCl (FIGURA 25).

Como as carragenanas analisadas, K e KOx, possuem massas molares semelhantes ($18 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$), a contribuição da massa para as mudanças observadas foram descartadas. Assim, a não gelificação de KOx pode estar relacionada ao grupamento carboxílico, que somado ao efeito da posição do sulfato, influencia no ordenamento conformacional (NECAS E BARTOSIKOVA, 2013), sugerindo que mudanças tridimensionais podem ter ocorrido, influenciando na formação do gel. Essas observações estão em concordância com os trabalhos de Cao e Shoichet (2002) e Forget et al. (2013) que observaram géis mais fracos após a oxidação C6 seletiva da agarose, pertencente a família das galactanas. No trabalho de Forget et al. (2013), foi mostrado que após a oxidação de κ -carragenana há uma reorganização molecular da estrutura passando a coexistir dois elementos estruturais secundários, α -hélice e folha β , em um único polissacarídeo, deixando de existir na forma helicoidal para estruturas em forma de disco (FIGURA 6).

A FIGURA 26 apresenta G' em função da concentração de KCl após as rampas de temperatura. Comparando a FIGURA 25 com a FIGURA 26, pode-se observar que apenas a κ -carragenana na concentração de 0,5 mol/L manteve a estrutura de gel promovendo estabilidade térmica estrutural.

FIGURA 26 - MÓDULO ELÁSTICO (G') EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE KCl APÓS RAMPAS DE TEMPERATURA.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: K = κ -carragenana; K-0,1K = κ -carragenana com 0,1 mol/L de KCl; K-0,5K = κ -carragenana com 0,5 mol/L de KCl; K-1K = κ -carragenana com 1 mol/L de KCl; KOx = κ -carragenana oxidada; KOx-0,1K = κ -carragenana oxidada com 0,1 mol/L de KCl; KOx-0,5K = κ -carragenana oxidada com 0,5 mol/L de KCl; KOx-1K = κ -carragenana oxidada com 1 mol/L de KCl.

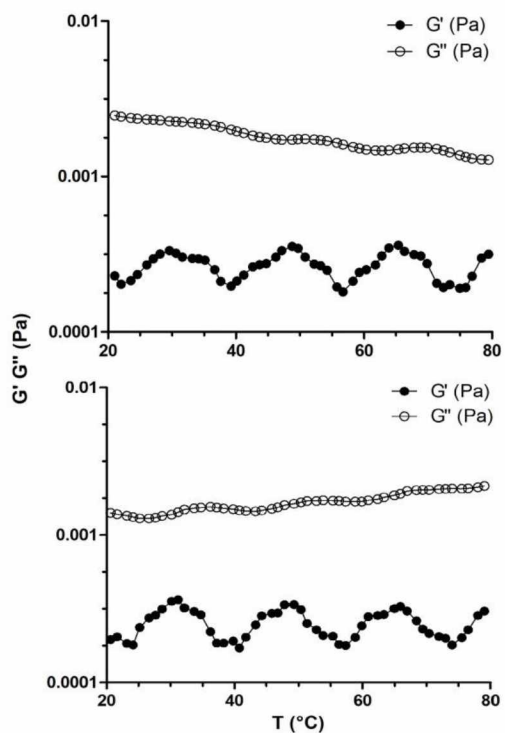
NOTA: Valores de G' foram obtidos das varreduras de frequência das respectivas amostras. A fase gel corresponde as amostras que apresentaram comportamento de gel, ou seja, o módulo $G' > G''$ durante a varredura de frequência. A fase líquida corresponde as amostras que apresentaram comportamento de líquido, ou seja, módulos $G'' > G'$ durante a varredura de frequência.

Em um segundo experimento, buscou-se também avaliar o efeito do íon Ca^{2+} na estrutura de κ -carragenana oxidada (KOx), pois por ser um íon divalente acreditava-se que ele poderia complexar-se com os grupos carboxílico e sulfato promovendo a gelificação. No entanto, os G' obtidos foram similares aos encontrados para a κ -carragenana sem adição de cátion. Para comparação, na FIGURA 27 é apresentado os valores de G' e G'' em função da variação de temperatura para K e KOx (FIGURA 27 a e b) e na presença dos cátions K^+ e Ca^{2+} , ambos na concentração de 1 mol/L (FIGURA 27c, d, e, e f).

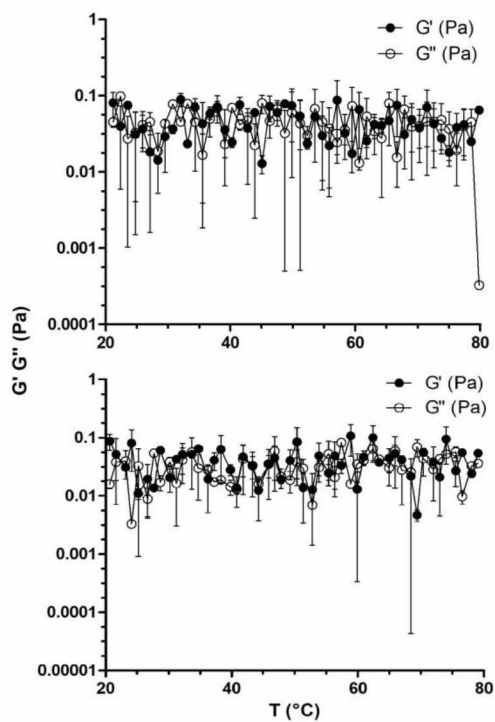
Em geral, na presença de Ca^{2+} G'' foi superior a G' em toda a variação de temperatura, configurando um líquido viscoso para as soluções de K (FIGURAS 27c). No trabalho de Robal et al. (2018) também não foi observada a gelificação de κ -carragenana na presença de Ca^{2+} .

FIGURA 27 - G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DA FRAÇÃO K E KOX NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS CÂTIONS K^+ E Ca^{2+} .

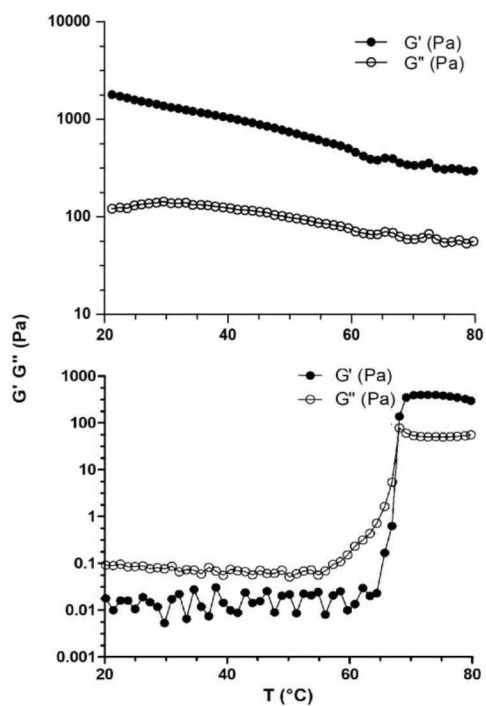
(continua)



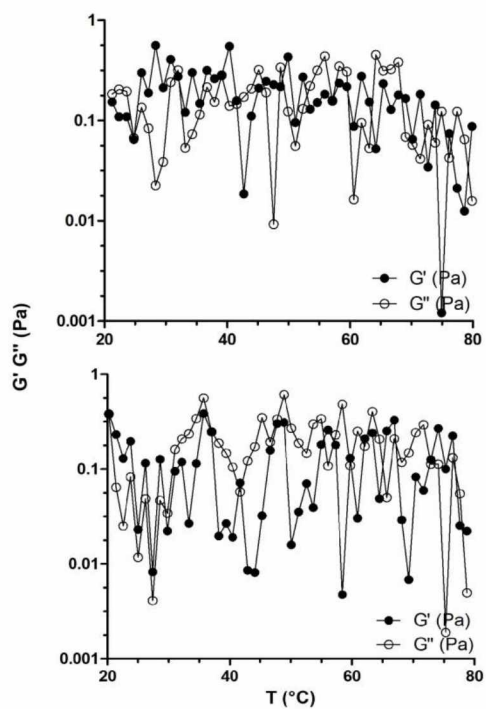
(a)



(b)



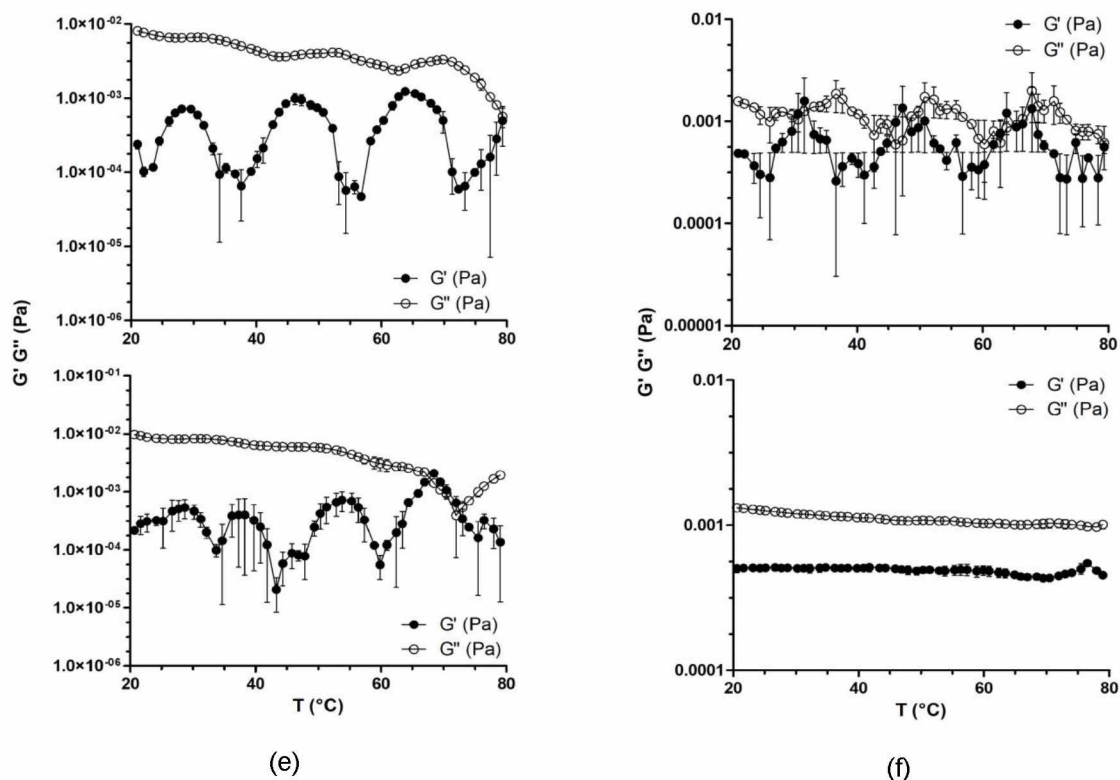
(c)



(d)

FIGURA 27 - G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DA FRAÇÃO K E KOx NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS CÁTIONS K^+ E Ca^{2+} .

(conclusão)



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Rampa de temperatura realizada em modo CS. Aquecimento de 20 °C a 80 °C a uma taxa de 1°C/min (fig. superior) e resfriamento de 80 °C até 20 °C na mesma taxa (fig. inferior). Os gráficos referem-se as amostras (a) K sem adição de íon; (b) KOx sem adição de íon; (c) K na presença de KCl 1 mol/L; (d) KOx na presença de KCl 1,0 mol/L; (e) K na presença de $CaCl_2$ 1 mol/L e (f) KOx na presença de $CaCl_2$ 1 mol/L.

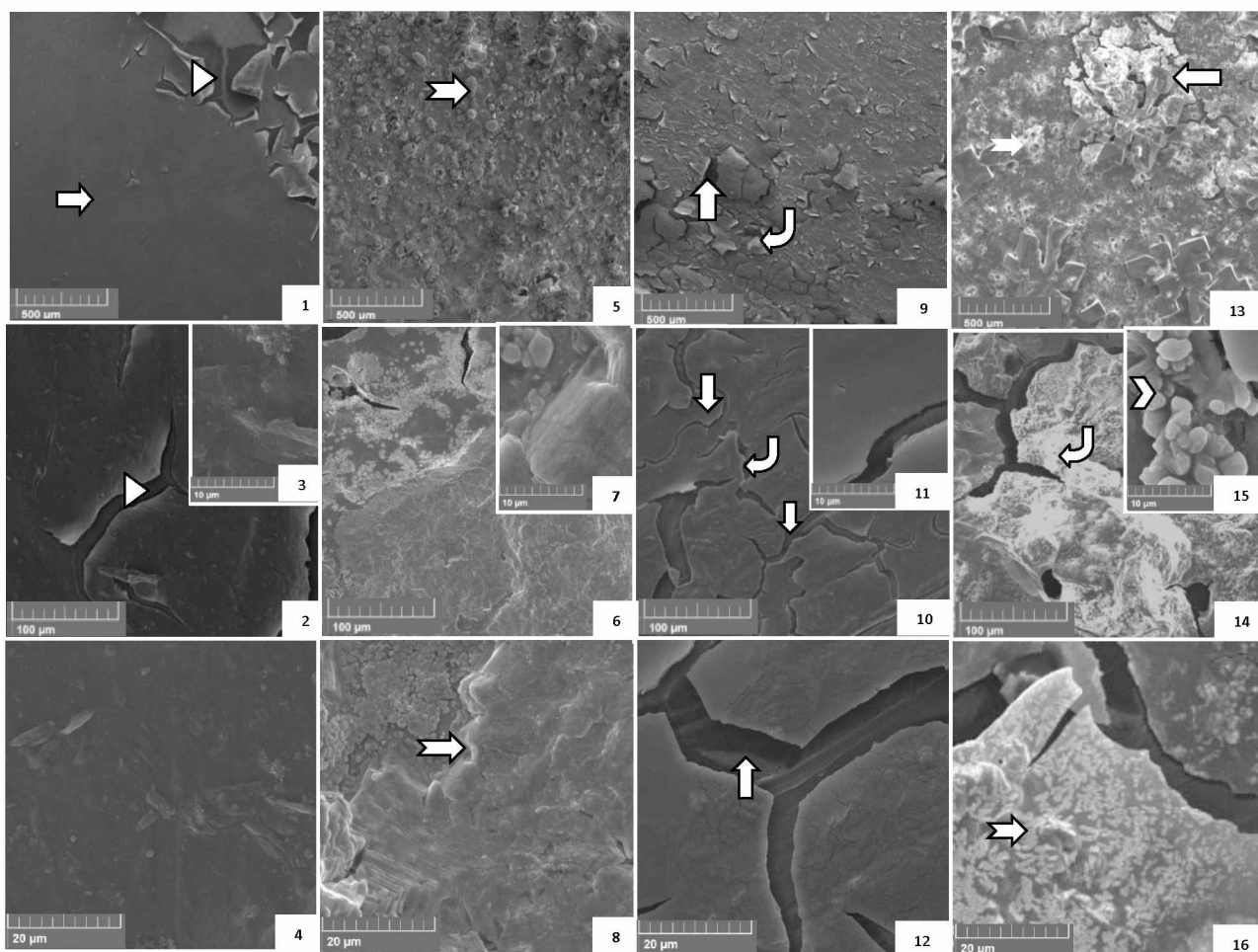
KOx não gelificou sem adição de cátion e para todas as concentrações de K^+ e Ca^{2+} , como pode ser visto na FIGURA 27. Contudo, na presença de Ca^{2+} apresentou um efeito na diminuição da oscilação, como pode ser observado na FIGURA 27f. Embora esse efeito não tenha sido significativo, pois não aumentou o valor de G' , a presença de Ca^{2+} na estrutura de KOx fez com que não apresentasse a oscilação de G' e G'' frente a variação de temperatura.

De acordo com Michel, Mestdagh e Axelos (1997), os cátions divalentes como o Ca^{2+} são mais efetivos em aumentar G' de ι-carragenana (que possui 2 grupos sulfato por díade) do que os cátions monovalentes, o que leva a sugerir que KOx poderia ser mais estabilizada, por possui o mesmo número de cargas.

4.2.6 Microscopia eletrônica de Varredura

A microestrutura de K e KOx foi visualizada utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FIGURA 28) a fim de visualizar se estas apresentariam diferenças estruturais entre elas e após a adição de KCl.

FIGURA 28 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE K E KOx NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE K⁺.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Análise em duplicata de um filme sólido formado após 4 deposições sucessivas sob o suporte de uma fase líquida de κ -carragenana nativa (K) ou oxidada (KOx) na concentração de 10 mg/mL (1 %) com volume total de 0,5 mL a 40 °C. K: Imagens de 1-4; K + KCl: Imagens de 5-8; KOx: Imagens de 9-12; KOx + KCl: Imagens de 12-15. Magnitudes de 100 x (Imagens 1, 5, 9 e 13), 600 x (Imagens 2, 6, 10 e 14), 3000 x (Imagens 3, 7, 11 e 15) e 6000 x (Imagens 4, 8, 12 e 16). ▷ Filme com fragmentações; ⇨ Superfície lisa e homogênea sem material particulado; ⤴ Filme mais frágil; ⤵ Áreas fragmentadas de diferentes formas e tamanhos; ⇩ Superfície irregular, granulada de aspecto mais denso; ⤶ Aspecto irregular com grande material agregado; ⤷ Estrutura menos compacta e menos densa; ⤴ Estrutura mais quebradiça, fragmentada em blocos de agregados.

Na FIGURA 28, as imagens 1-4 evidenciam padrão de arquitetura e ultraestrutura da fração K. Pode-se observar em menor magnitude (FIGURA 28, imagem 1 e 2) que este polissacarídeo na concentração de 10 mg/mL em 0,5 mL demonstrou formar um filme com fragmentações. Este evidencia padrão de uma superfície lisa, homogênea e regular, sendo frágil pela presença de nítidas fragmentações (FIGURA 28, imagem 1 e 2). Há um predomínio de uma superfície lisa e homogênea sem material particulado. De forma interessante, pode-se observar que KOx (FIGURA 28, imagens de 9-12), de forma semelhante, também formou um filme o qual mostrou pelas imagens 9-12 ser mais frágil que o filme de K. Observa-se grandes áreas fragmentadas de diferentes formas e tamanhos. Estruturalmente estes dois polissacarídeos são semelhantes no padrão de polimerização do filme formado.

De forma evidente, K após adição de KCl altera o padrão morfológico e estrutural. Observa-se uma superfície irregular, granulada de aspecto mais denso (FIGURA 28, imagens 5-8). Semelhante aspecto irregular com grande material agregado também pode ser observado para KOx com a adição de KCl (FIGURA 28, imagens 13-16). Chama-se a atenção que para este tratamento a estrutura está menos compacta e menos densa, mais quebradiça, fragmentada em blocos de agregados, mostrando a alteração microestrutural após a inserção da carboxila.

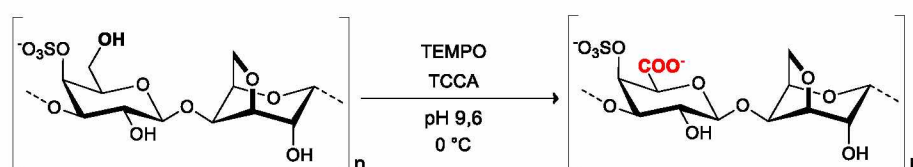
4.3 PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE *KAPPA*-CARRAGENANA C6 OXIDADA

4.3.1 Obtenção e oxidação C6 seletiva da fração KR

A obtenção de oligossacarídeos a partir κ -carragenana C6 oxidada iniciou-se com a oxidação C6 seletiva de um novo lote de κ -carragenana obtida de *Kappaphycus alvarezii* (Amostra K). Como as reações de oxidação seletiva ocorrem em pH alcalino, foi realizada a redução dos terminais redutores da amostra K com NaBH_4 a fim de evitar a β -eliminação (ASPINALL, 1982). A amostra reduzida, dialisada e liofilizada apresentou rendimento de 84 % e foi nomeada como KR.

Em seguida a amostra KR foi submetida à oxidação C6 seletiva (SANTOS, 2015) (FIGURA 29) utilizando os reagentes TEMPO e TCCA em tampão bicarbonato 0,2 mol/L, pH 9,6. Após a diálise e liofilização, foi obtido rendimento de 81%, e o produto foi nomeado como KO. O produto da oxidação seletiva foi analisada utilizando o RMN ^1H para a quantificação das unidades de β -D-GalAp-4-sulfato geradas (FIGURA 30).

FIGURA 29 - OXIDAÇÃO C6 SELETIVA DA AMOSTRA K

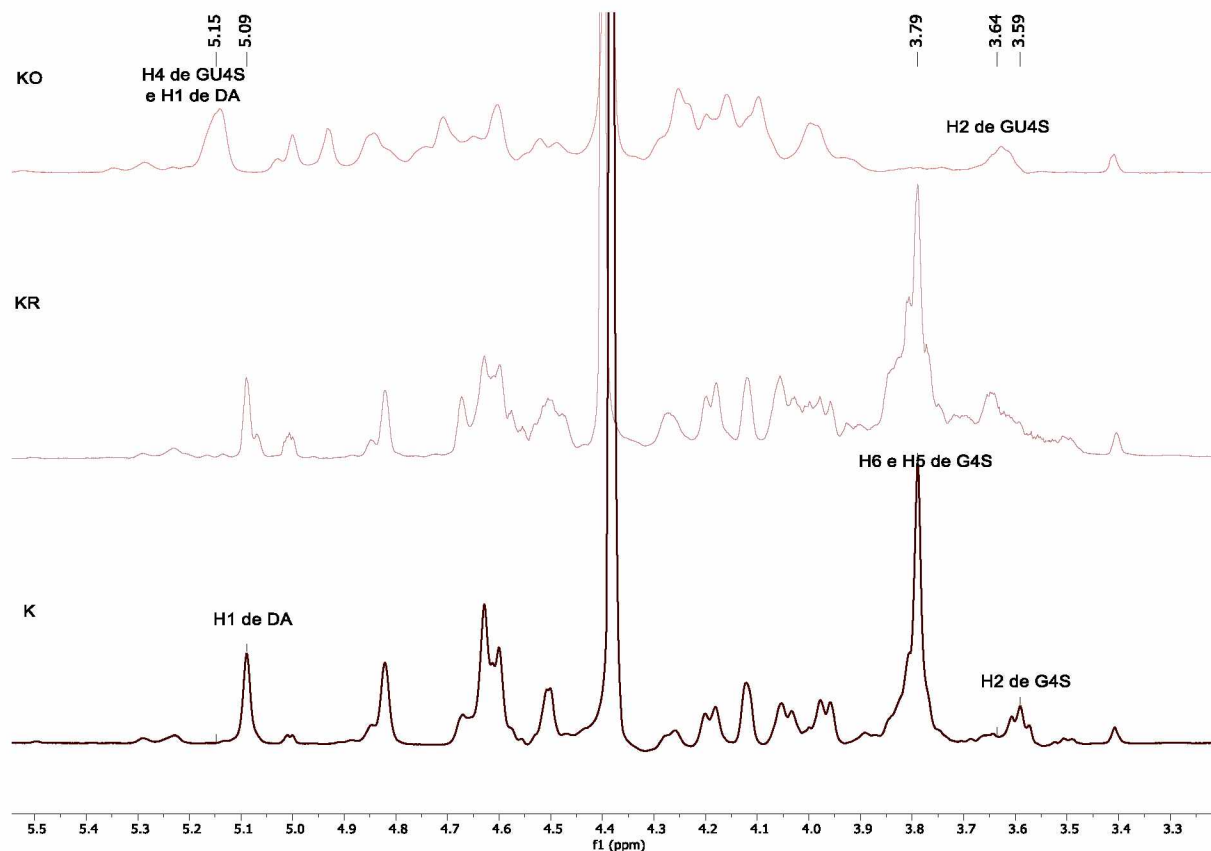


FONTE: O autor (2019).

Na FIGURA 30 observa-se o RMN de ^1H das amostras K, KR e KO, onde observa-se alguns sinais que caracterizam cada amostra. Para a amostra K (κ -carragenana) são observados os deslocamentos em 5,09 ppm correspondentes ao H-1 da unidade 3,6-anidro- α -galactopirranose. O espectro de KR é semelhante a amostra não reduzida K. Para KO (κ -carragenana oxidada), o H-4 da unidade β -D-GalAp4S e o H-1 da unidade de 3,6-anidro- α -D-galactopirranose são observados sobrepostos em 5,15 ppm. Observa-se a ausência do sinal em 3,79 ppm correspondentes aos hidrogênios sobrepostos H6 e H5 da unidade G4S de κ -carragenana (local da oxidação) (USOV; SHASHKOV, 1985; VAN DE VELDE et al.,

2002; VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Esses deslocamentos indicaram que a oxidação ocorreu completamente, com uma taxa de oxidação de $DO_x = 96\%$ (Equação 1).

FIGURA 30 - ESPECTROS DE RMN 1H DAS AMOSTRAS K, KR E KO.

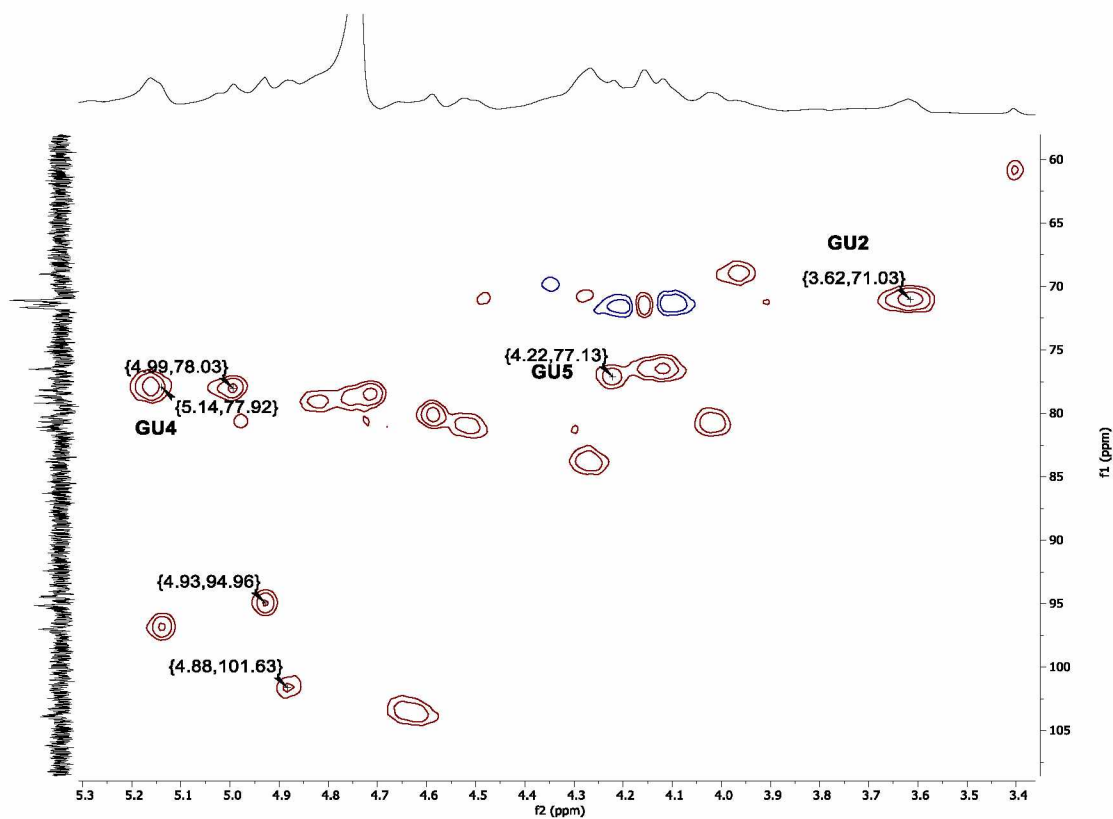


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectros realizados em 500 MHz, 60 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).

A FIGURA 31 apresenta o mapa de correlação bidimensional heteronuclear 1H - ^{13}C de HSQC da amostra KO, onde é possível observar a ausência das correlações 63,6/3,79 e 77,1/3,79 ppm, correspondentes a G6/H6a e H6b e G5/H5 da unidade β -D-Galp 4-sulfato. Com a oxidação, o hidrogênio H5 na unidade de β -D-GalAp 4-sulfato é submetido a um novo ambiente químico, causando o deslocamento do seu sinal de 3,79 ppm para campo mais baixo (4,22 ppm). Ressalta-se ainda a correlação de GU4/H4 na unidade GU4S em 5,14/77,9 ppm, indicando a permanência do grupo sulfato na estrutura polissacarídica, importante para várias atividades biológicas relatadas para as carragenanas (ARAÚJO et al., 2013; COSENZA et al., 2015; SANTOS, 2015).

FIGURA 31 - MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL HETERONUCLEAR ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DA FRAÇÃO KO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectro realizado em 500 MHz, 25 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C).

Nesta oxidação foi possível observar a existência de correlações assinaladas em 101,6/4,88 ppm, 95,0/4,93 ppm e 78,0/4,99 ppm que condizem com o C2 oxidado da unidade 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose relatada por Cosenza e colaboradores (2015), que realizaram a oxidação de κ -carragenana com TEMPO/NaOCl-NaBr. A oxidação de hidroxilas secundárias em carboidratos foi apontada como uma reação lateral, já observada em outros trabalhos utilizando o reagente TEMPO (NOOY; BESEMER; VAN BEKKUM, 1995; SU et al., 2013). De acordo com Cosenza et al. (2015) esta reação não é observada quando é adicionado o agente redutor NaBH_4 , pois a oxidação de um carbono secundário gera uma cetona, que após a redução com o NaBH_4 forma-se um álcool secundário, porém no presente trabalho, mesmo após a adição do agente redutor foi observada a oxidação em C2 das unidades de DA. Assim, como uma perspectiva futura essa questão merece ser investigada, pois sugere que outros efeitos estão associados a oxidação em C2.

4.3.2 Produção de oligossacarídeos alditóis a partir de KO

Inicialmente, foi iniciada uma investigação do perfil de hidrólise da κ -carragenana C6 oxidada. Dessa forma, a amostra KO foi hidrolisada por 8 h com TFA 0,1 mol/L, em estufa, sendo recolhido alíquotas a cada 1 h de reação. Foram realizadas hidrólises em três temperaturas diferentes, 55°C, 65°C e 85°C. As alíquotas recolhidas foram rotaevaporadas e liofilizadas. Em seguida, analisadas por RMN ^1H (FIGURA 32).

FIGURA 32 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DE κ -CARRAGENANA OXIDADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

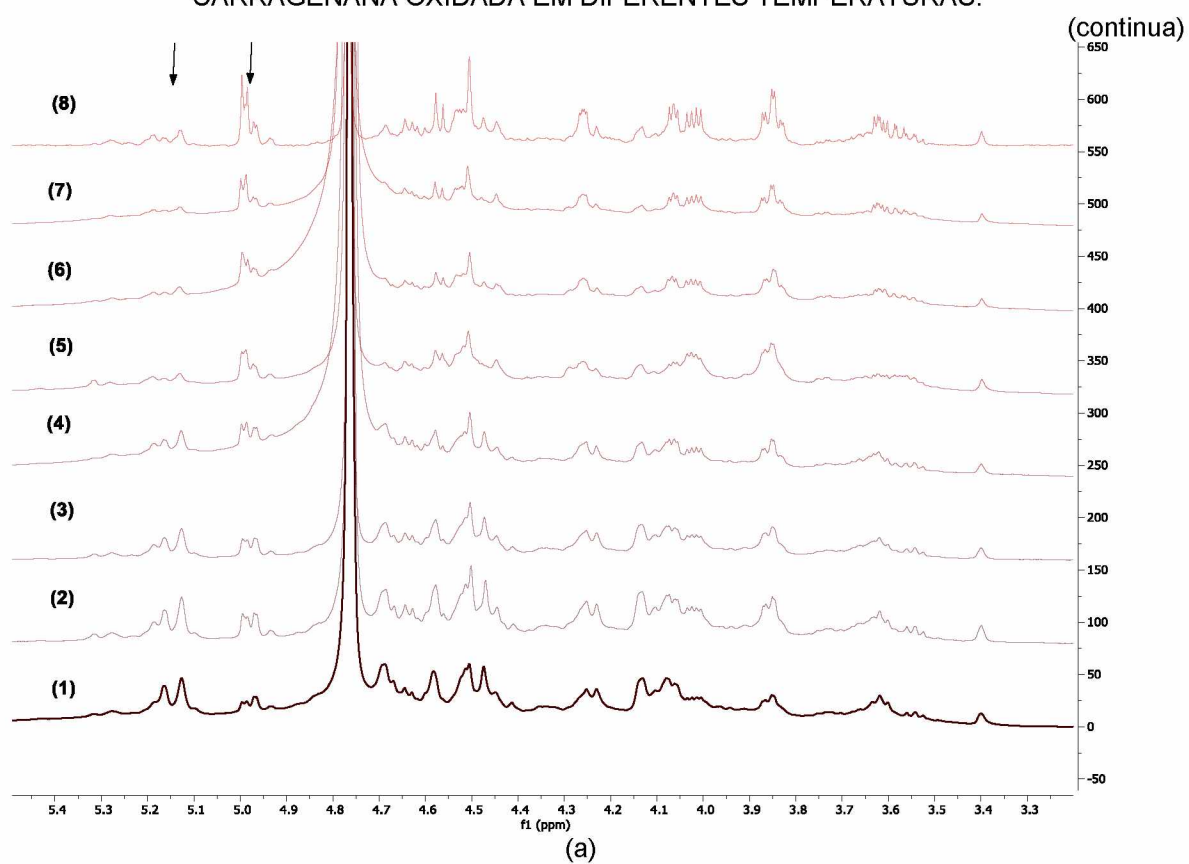
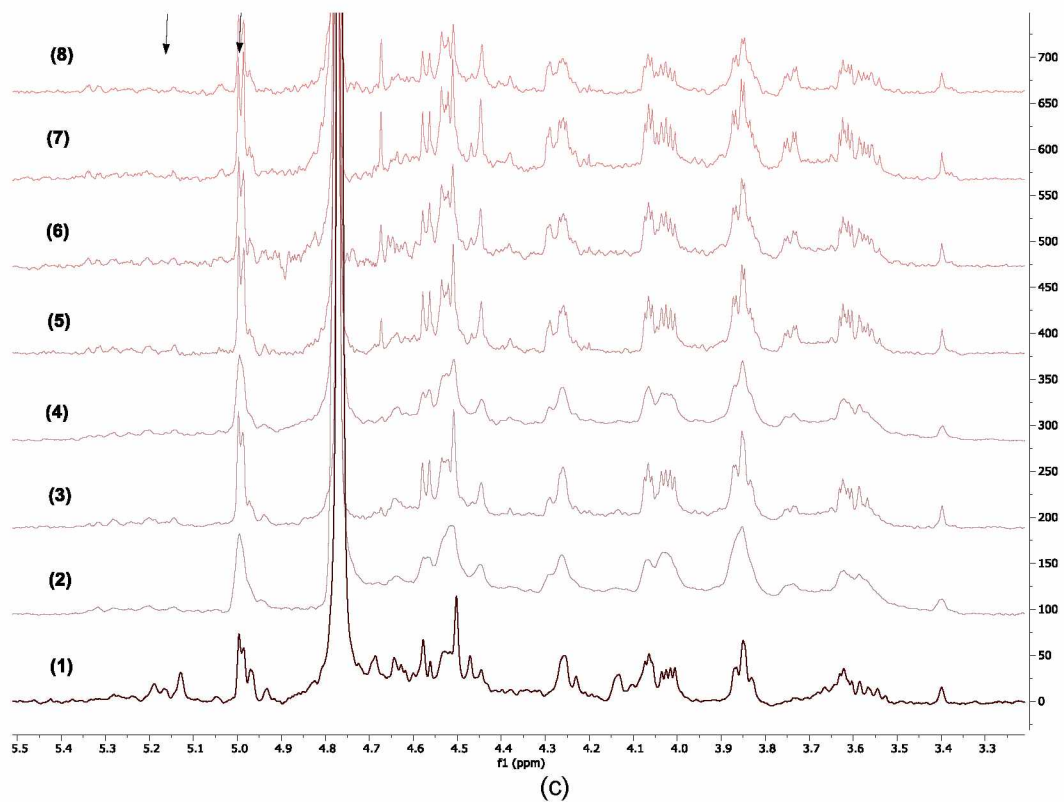
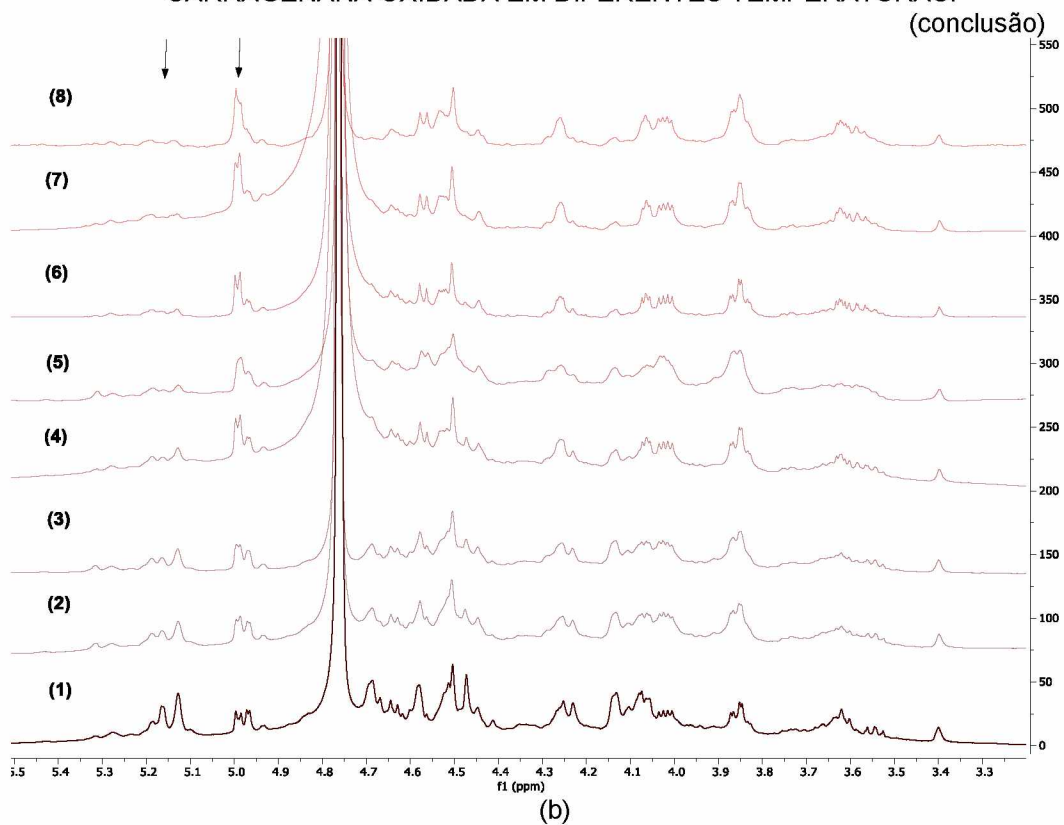


FIGURA 32 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS MISTURAS HIDROLISADAS DE κ -CARRAGENANA OXIDADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectros realizados em 500 MHz, 25 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$). Hidrólise realizada a (a) 55 °C, (b) 65 °C e (c) 85 °C. Os números em cada espectro representam o tempo (horas) de hidrólise.

Na FIGURA 32, estão representados os espectros dos produtos de hidrólise da fração KO em diferentes temperaturas, 55, 65 e 85 °C, onde é possível observar que conforme o aumento da temperatura ocorre a diminuição do sinal em 5,14 ppm e o aumento do sinal na região de 5,00 ppm. Com isso, foi calculado a quantidade de unidades redutoras através da equação 4 (FIGURA 33), que fornece a relação em porcentagem de quanto aldeído hidratado é formado:

$$\% \text{ terminal redutor} = 100 \% - \left\{ \left[\frac{H4,1_{interno}}{(H4,1_{interno} + H4,1_{externo})} \right] \times 100 \% \right\} \quad (4)$$

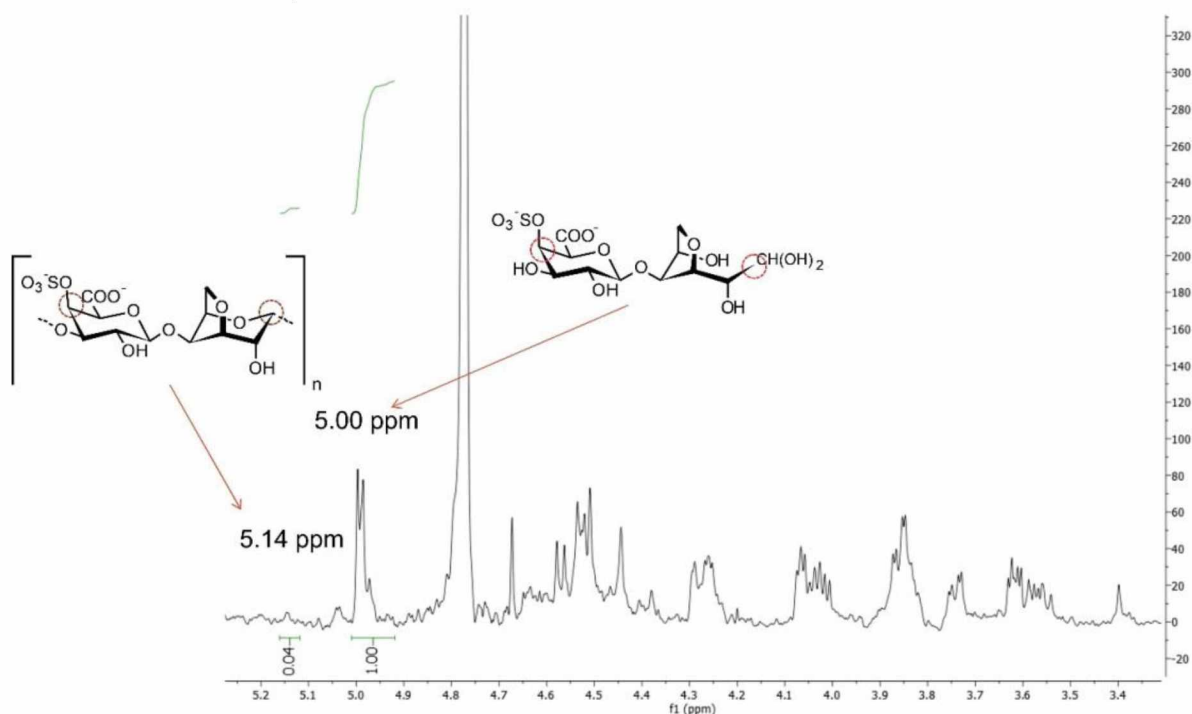
onde:

$H4,1_{interno}$ = representa a área do sinal em 5,14 ppm relativo ao H4 da unidade β -D-galactopiranosidurônico 4-sulfato e H1 da unidade 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose quando estas unidades estão em ligação α -(1 \rightarrow 3);

$H4,1_{externo}$ = representa a área do sinal em 5,00 ppm correspondente ao H4 da unidade β -D-galactopiranosidurônico 4-sulfato (terminal não redutor) e H1 da unidade 3,6-anidro-D-galactose (terminal redutor).

Dessa forma, altos valores de $H4,1_{interno}$ indicam que existem muitas unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose ligadas, ou seja, uma baixa taxa de hidrólise com pouca produção de aldeído hidratado (TABELA 8).

FIGURA 33 - QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES REDUTORAS DE KOx FORMADAS PARA A CONDIÇÃO C3 UTILIZANDO RMN DE ^1H



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectro realizado em 500 MHz, a 25 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$).

A TABELA 8 apresenta a porcentagem da área integrada dos sinais de unidades internas do polissacarídeo em relação aos sinais do terminal redutor calculadas por RMN de ^1H através da Equação 4. Como pode ser observado, até a temperatura de 65 °C havia a presença de unidades redutoras e de unidades 3,6-anidro- α -D-galactopiranoses ligadas. Na temperatura de 85 °C, em 2 h houve a hidrólise quase completa das ligações 3,6-An- α -D-Galp e a partir de 3 h o desaparecimento total do sinal em 5,15 ppm indicando que somente dissacarídeos foram formados. Dessa forma, os oligossacarídeos são obtidos de acordo com a condição de hidrólise utilizada.

No trabalho de Stevenson e Furneaux (1990), foi realizada a hidrólise redutiva parcial da κ -carragenana com 0,1 mol/L de TFA a 80 °C. Resultados parecidos foram encontrados, onde o rendimento máximo de unidades redutoras foi alcançado com 2 h de hidrólise.

Os produtos da hidrólise ácida parcial da κ -carragenana com 0,1 mol/L de TFA a 65 °C foi monitorada por Figueiredo e colaboradores (2019) através da quantificação por eletroforese capilar. De acordo com os resultados apresentados, a hidrólise parcial completa seria alcançada em 15 h. Na TABELA 8, pela integração

no RMN de ^1H para a amostra b8 teria-se 84 % de unidades 3,6-AnGalp redutora (terminais redutores). Fazendo uma extrapolação por meio de regressão linear dos dados na mesma temperatura, utilizando a equação da reta ($y = 5,1429x + 37,107$ e $R^2 = 0,88$), a hidrólise na temperatura de 65 °C das ligações 3,6-An- α -D-Galp de κ -carragenana oxidada seria completada em 12 h.

Assim, essas comparações sugerem que a presença do grupo carboxila na estrutura de κ -carragenana aparenta não ter influência sobre o tempo de hidrólise.

TABELA 8 - ESTUDO DA HIDRÓLISE ACIDA PARCIAL DE KO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Amostra	T (° C)	Tempo (h)	% terminal reductor
a1	55	1	32
a2	55	2	42
a3	55	3	42
a4	55	4	57
a5	55	5	58
a6	55	6	58
a7	55	7	59
a8	55	8	69
b1	65	1	48
b2	65	2	48
b3	65	3	45
b4	65	4	56
b5	65	5	65
b6	65	6	67
b7	65	7	69
b8	65	8	84
c1	85	1	60
c2	85	2	90
c3	85	3	95
c4	85	4	95
c5	85	5	95
c6	85	6	95
c7	85	7	95
c8	85	8	95

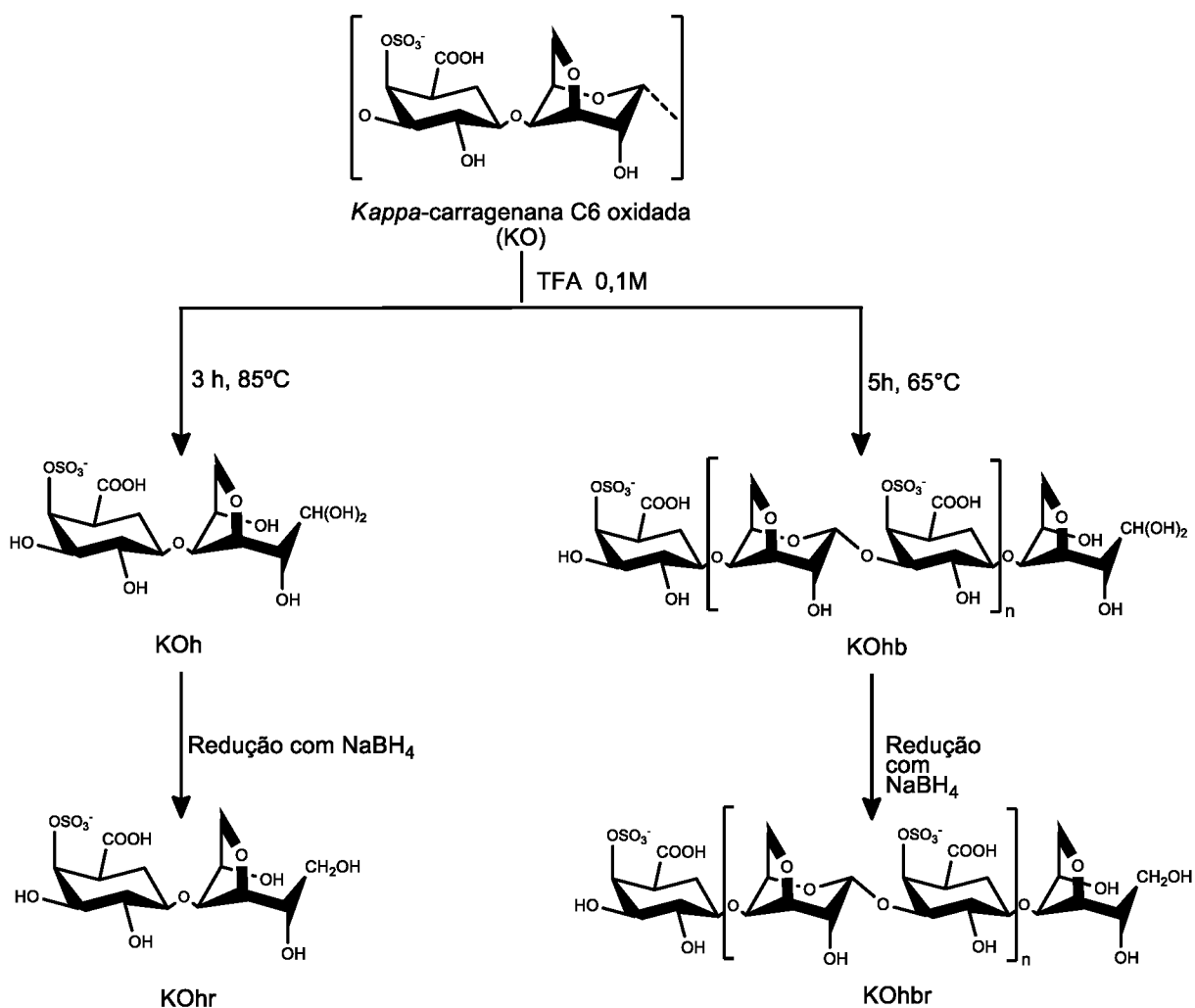
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: ^aQuantidade de terminal reductor formada após a hidrólise calculada utilizando a Equação 4.

Com o intuito de isolar o dissacarídeo proveniente da κ -carragenana C6 oxidada, KO foi hidrolisada em escala preparativa (620 mg), com TFA 0,1 mol/L por 3 h à 85 °C (FIGURA 34) gerando a fração KOhr, que em seguida, foi reduzida com NaBH_4 para produzir os oligossacarídeos alditóis, recuperando 945 mg (KOhr), após

liofilização, pois além da massa do oligossacarídeo está presente o excesso de NaBH_4 , que só é eliminado na etapa de purificação, utilizando as cromatografias aniônica e gel permeação.

FIGURA 34 - PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS OXIDADOS VIA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA AMOSTRA KO.

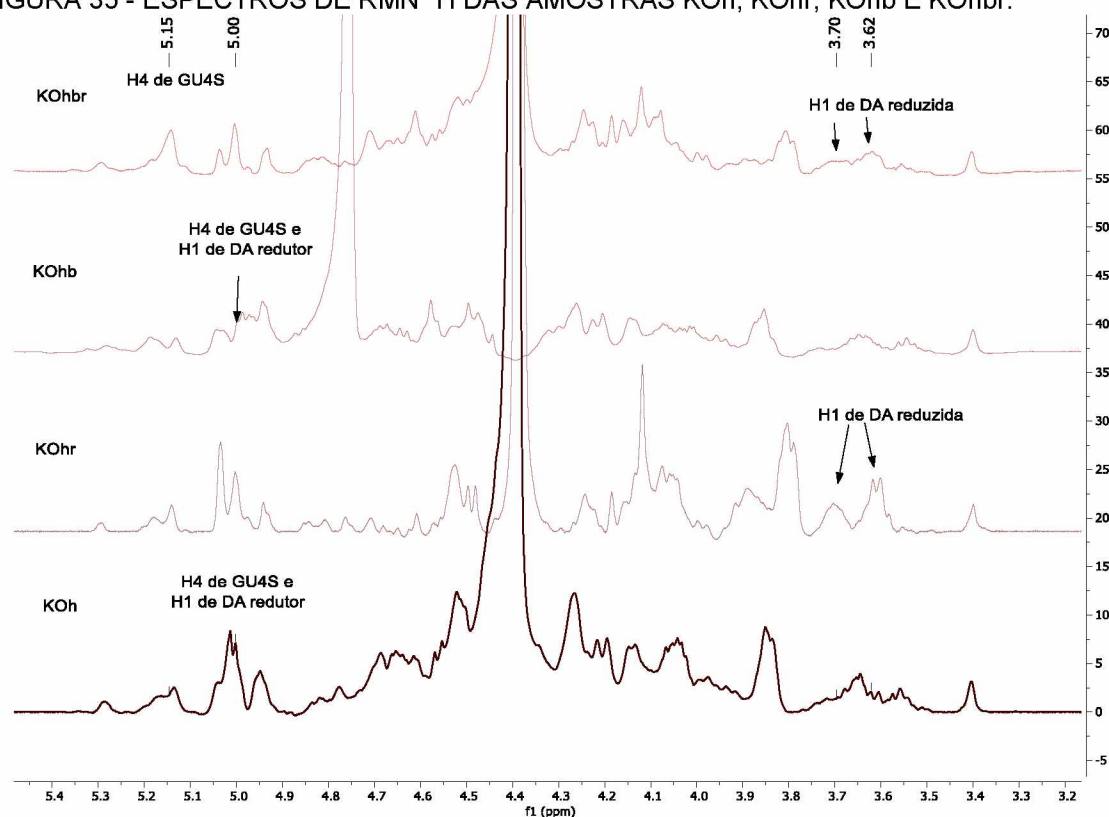


FONTE: O autor (2019).

Para obtenção de oligossacarídeos de maior massa molar, foi utilizada a condição a 65°C , por 5 h, em escala preparativa de 700 mg, que gerou a fração KOhb. Esta fração foi reduzida e, após liofilização, foi recuperado 965 mg (produto da hidrólise + NaBH_4 adicionado para a redução do terminal redutor), sendo nomeada de KOhbr. Experimentos de RMN de ^1H foram realizados para as frações antes (KOh e KOhb) e após as reduções com borohidreto de sódio (KOhr e KOhbr).

A FIGURA 35 apresenta os espectros de RMN ^1H destas frações, onde observa-se para KOH e KOHb o sinal em 5,00 ppm correspondentes a H4 da unidade $\beta\text{-D-GalAp 4-sulfato}$ e H1 da unidade de 3,6-anidro- $\alpha\text{-D-galactopiranosse}$ na forma de aldeído hidratado.

FIGURA 35 - ESPECTROS DE RMN ^1H DAS AMOSTRAS KOH, KOhr, KOHb E KOhbr.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectros realizados em 500 MHz, a 60 °C e 25 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$).

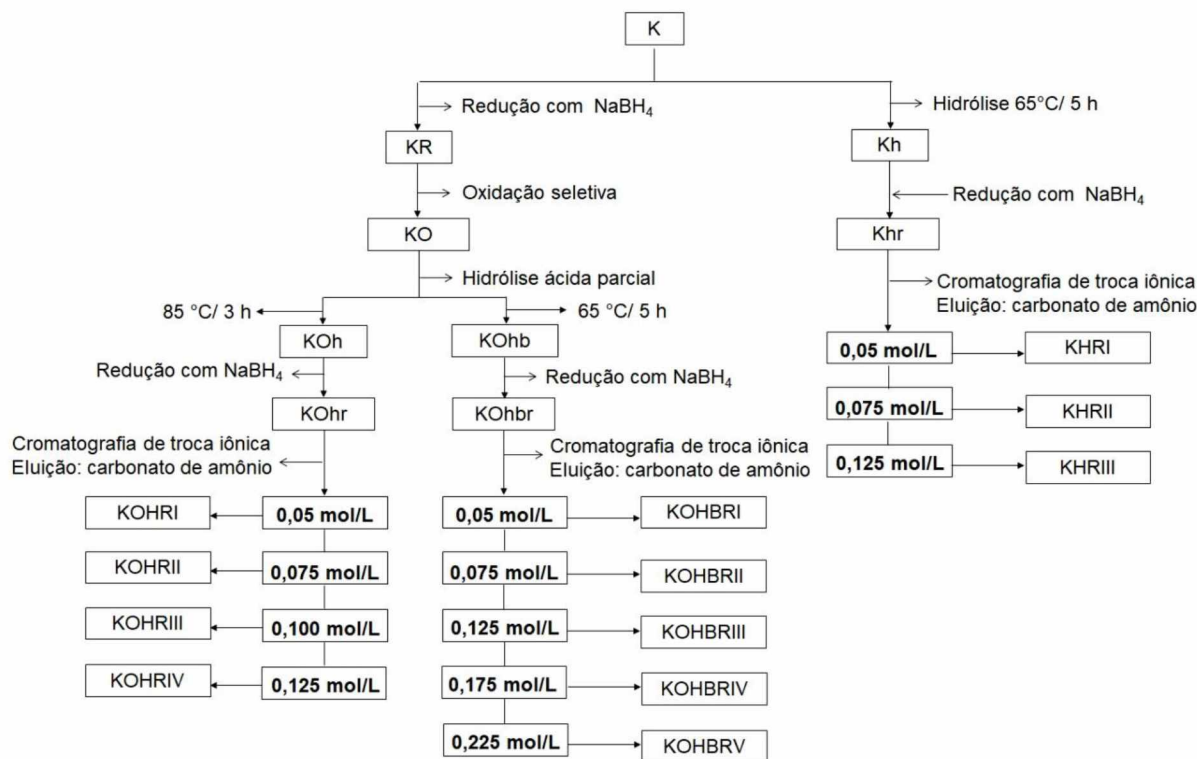
Após as reduções das frações, foi observado em KOhr e KOhbr (FIGURA 35) o deslocamento de H1 da unidade 3,6-anidrogactose de 5,00 ppm para 3,62 ppm e 3,70 ppm (H1 e H1' da mesma unidade), confirmando que a redução ocorreu. Contudo, o sinal em 5,00 ppm não desapareceu completamente após as reduções pois, também corresponde a algum hidrogênio não identificado do intermediário C2 oxidado da unidade de 3,6-anidrogactopiranosse (COSENZA et al., 2015).

Obtidas as misturas de oligossacarídeos alditóis, elas foram purificadas em colunas de troca aniônica com o objetivo de isolar os oligossacarídeos alditóis.

4.3.3 Purificação de KOhr e caracterização dos oligossacarídeos alditóis isolados.

A mistura de oligossacarídeos alditóis KOhr preparada em escala preparativa a partir da hidrólise de KO a 85 °C por 3 h (FIGURA 34), foi purificada utilizando a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE–Sephadex. A FIGURA 36 apresenta um fluxograma para ilustrar a obtenção dos oligossacarídeos a partir da κ -carragenana oxidada (KO) e κ -carragenana (K), próxima fração a ser hidrolisada. A fração KO foi hidrolisada em duas condições diferentes. Os oligossacarídeos obtidos nas três diferentes condições foram purificados através da cromatografia de troca aniônica utilizando como eluente água destilada e solução de carbonato de amônio em diferentes concentrações.

FIGURA 36 - OBTENÇÃO DAS SUBFRAÇÕES PRODUZIDAS A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE K E KO



FONTE: O autor (2019).

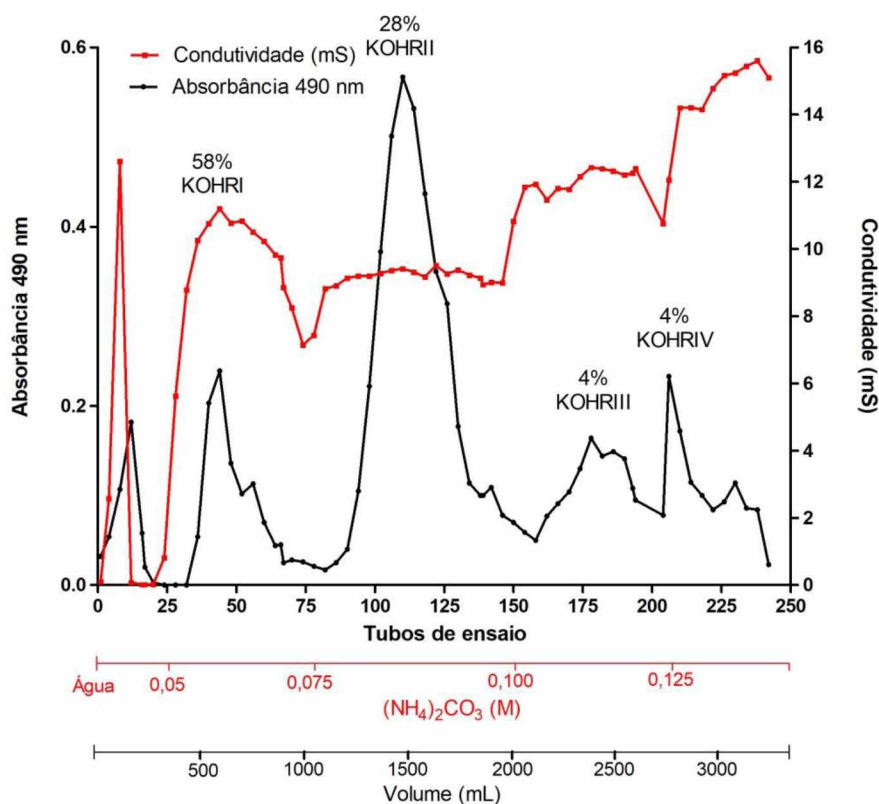
A eluição foi realizada inicialmente com água destilada e, em seguida, com diferentes concentrações molares de carbonato de amônio – 0,05 mol/L; 0,075 mol/L; 0,100 mol/L e 0,125 mol/L. A presença de carboidratos foi detectada conforme descrito por Dubois e colaboradores (1956) e a concentração de íons em

solução foi monitorada indiretamente medindo-se a condutividade. O perfil de eluição cromatográfico está apresentado na FIGURA 37.

Na FIGURA 37 observa-se o cromatograma obtido em coluna aniônica da amostra KOhr com quatro picos para as seguintes concentrações de carbonato de amônio: 0,05; 0,075, 0,100 e 0,125 mol/L, respectivamente. Os picos foram agrupados da seguinte maneira:

- tubos de ensaio 36-66 (KOHRI)
- tubos de ensaio 96-148 (KOHRII)
- tubos de ensaio 166-197 (KOHRIII)
- tubos de ensaio 204-238 (KOHRIV)

FIGURA 37 - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO KOhr.



FONTE: O autor (2019).

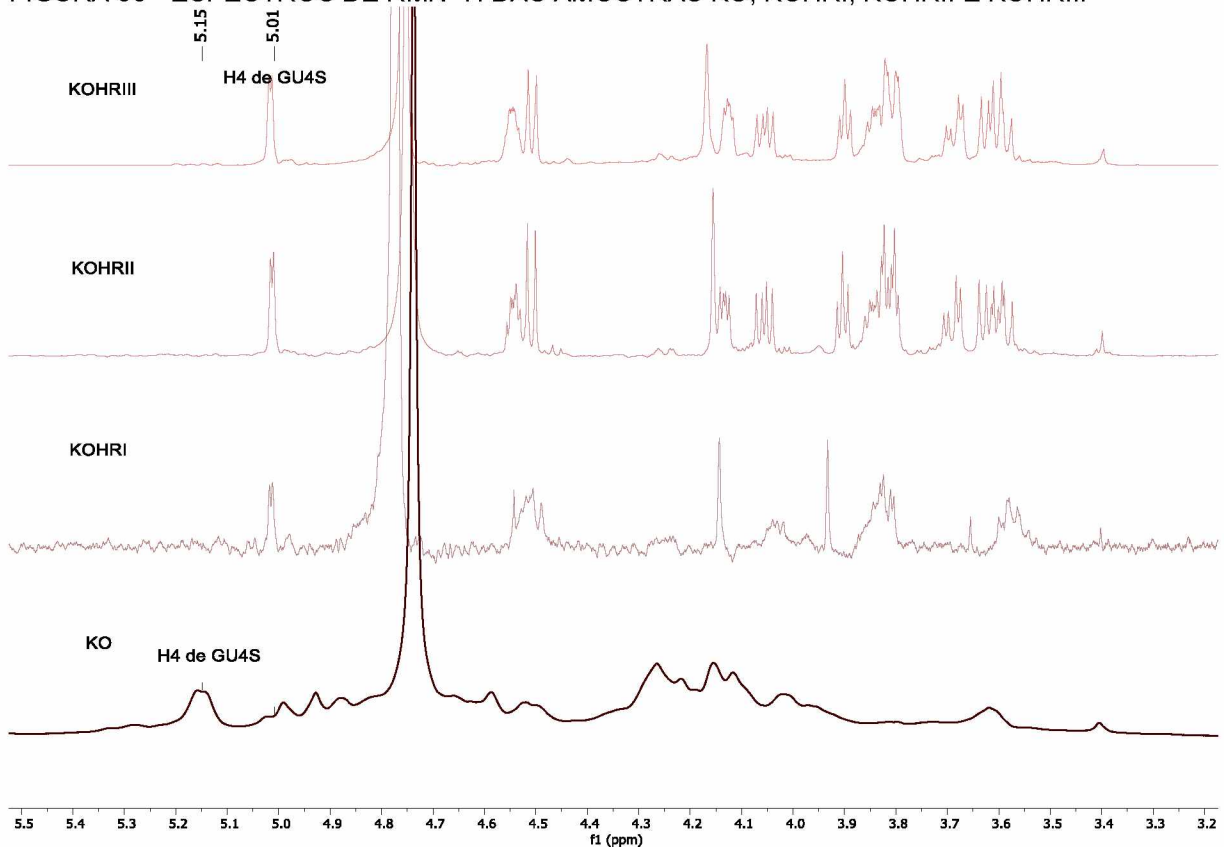
Após todos os picos agrupados, as frações resultantes foram rotaevaporadas extensivamente com água para eliminação do carbonato de amônio na forma de CO_2 e NH_3 e em seguida, liofilizadas. Os rendimentos das subfrações KOHRI, KOHRII, KOHRIII e KOHRIV foram, respectivamente 58 %, 28 %, 4 % e 2

%. Pela fração KOHRIV apresentar baixo rendimento, não foi dado procedimento a etapa de purificação por cromatografia de exclusão.

Para dessalinização e eliminação de subprodutos ainda presentes, as frações liofilizadas KOHRI, KOHRII e KOHRIII foram solubilizadas em água destilada na concentração de 2 mg/mL e submetidas à cromatografia de exclusão em coluna Bio-Gel P-2. A eluição foi realizada com água destilada. Para detecção de carboidratos e do sal, foram utilizados os mesmos métodos empregados na coluna de troca iônica.

Em seguida, as frações resultantes liofilizadas foram submetidas ao tratamento com resina trocadora de cátions (Dowex 50w x8) na forma de íons sódio (Na^+), para substituir o contra íon amônio (NH_4^+) pelo Na^+ . Após liofilização, as frações KOHRI, KOHRII e KOHRIII foram submetidas à análise de RMN de ^1H (FIGURA 38).

FIGURA 38 - ESPECTROS DE RMN ^1H DAS AMOSTRAS KO, KOHRI, KOHRII E KOHRIII



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectros realizados em 500 MHz, 25 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm) após purificação por cromatografia de troca iônica e exclusão de tamanho, e troca catiônica.

A FIGURA 38 apresenta os espectros de RMN de ^1H das frações KO, KOHRI, KOHRII e KOHRIII. É possível observar que para KOHRI, KOHRII e KOHRIII não existe o sinal em 5,09 ppm correspondente a H-1 de 3,6-anidro- α -D-Gal β ligada, sugerindo que o principal constituinte dessas frações seja o dissacarídeo β -D-GalA β -4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol. O sinal em 5,01 ppm corresponde ao H-4 da unidade de β -D-GalA β -4-sulfato, indicativo que o sulfato foi mantido após o processo de hidrólise.

A primeira fração eluída na coluna de troca iônica, KOHRI, apresentou baixa porcentagem de carboidratos (FIGURA 37) e grande quantidade de sal presente após sucessivas etapas de evaporação sob pressão reduzida. Assim, foi dado continuidade na caracterização apenas da fração KOHRII, pois a fração KOHRIII apresentou baixa recuperação.

Na FIGURA 39 são apresentados RMN bidimensionais (HSQC e COSY) da fração KOHRII.

FIGURA 39 - MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO (a) E ^1H - ^1H -COSY (b) DE KOHRII.

(continua)

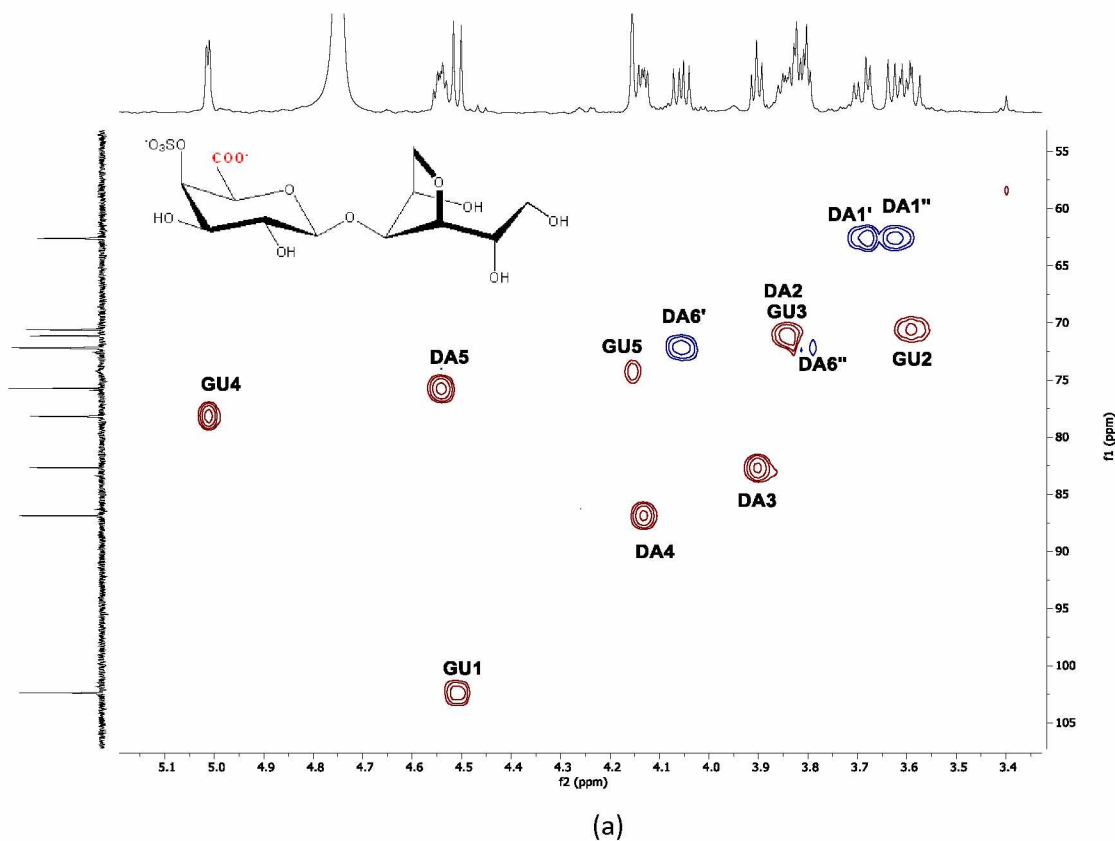
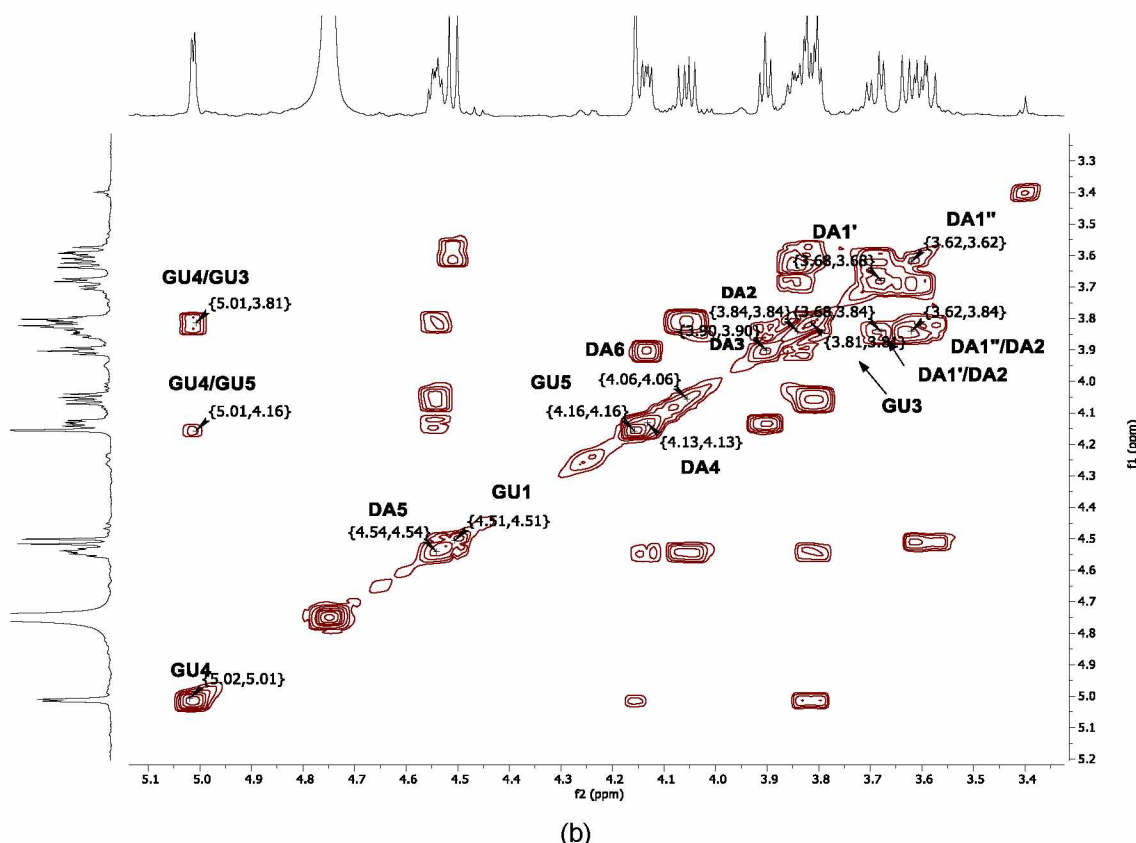


FIGURA 39 - MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO (a) E ^1H - ^1H -COSY (b) DE KOHR11.

(conclusão)



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectros adquiridos em 500 MHz, 25 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C). GU e DA correspondem a β -D-GalAp-4-sulfato e 3,6-AnGalOH, respectivamente.

Na FIGURA 39a é possível observar o mapa de correlação bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC editado da fração KOHR11. Dessa forma, em azul estão representados os grupos CH_2 em fase oposta a grupos CH e CH_3 , onde pode-se observar as correlações $72,1/4,06$ ppm e $72,1/3,79$ ppm correspondentes a $\text{DA6}'/\text{H6}$ e $\text{DA6}''/\text{H6}$. Ainda em fase oposta, em $62,6/3,62$ ppm e $62,6/3,68$ ppm, foram atribuídas as correlações de $\text{DA1}'/\text{H1}$ e $\text{DA1}''/\text{H1}$, indicando, portanto, que ocorreu a hidrólise das unidades 3,6-anidro- α -D-GalAp. A ausência da correlação $5,14/77,9$ ppm correspondente a β -D-GalAp 4-sulfato indica que não existem unidades 3,6-anidro- α -D-GalAp ligadas, indicando que o dissacarídeo β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol é o principal constituinte da fração. As demais correlações foram atribuídas baseadas no mapa de correlação da fração KO (FIGURA 31).

Para a confirmação dos assinalamentos foi realizado o experimento de correlação bidimensional ^1H - ^1H COSY (FIGURA 39b). Assim, por exemplo, pode-se

observar a correlação de DA1' (3,68 ppm) com o hidrogênio vicinal DA2 (3,84 ppm) em 3,68/3,84 ppm. Também observa-se as correlações de GU4 (5,01 ppm) com os hidrogênios vizinhos GU5 (4,16 ppm) e GU3 (3,81 ppm) em 5,01/4,16 ppm e 5,01/3,81 ppm, respectivamente.

O assinalamento completo da díade está apresentado na TABELA 9.

TABELA 9 - ASSINALAMENTOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DO DISSACARÍDEO β -D-GALAP-4-SULFATO-(1 \rightarrow 4)-3,6-ANIDRO-D-GALACTITOL (KOHRII)

Amostra	Unidade	Átomo ^a	Posição ^c							
			1'	1''	2	3	4	5	6'	6''
KOHRII β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol	β -D-GalAp 4-sulfato GU4S^b	^1H	4,51	-	3,59	3,81	5,01	4,16	-	-
		^{13}C	102,4	-	70,6	71,1	78,2	74,3	175,8	175,8
	3,6-An- α -Gal-OH DA	^1H	3,68	3,62	3,84	3,90	4,13	4,54	4,06	3,79
		^{13}C	62,6	62,6	71,1	82,7	86,7	75,7	72,1	72,1

FONTE: O autor (2019).

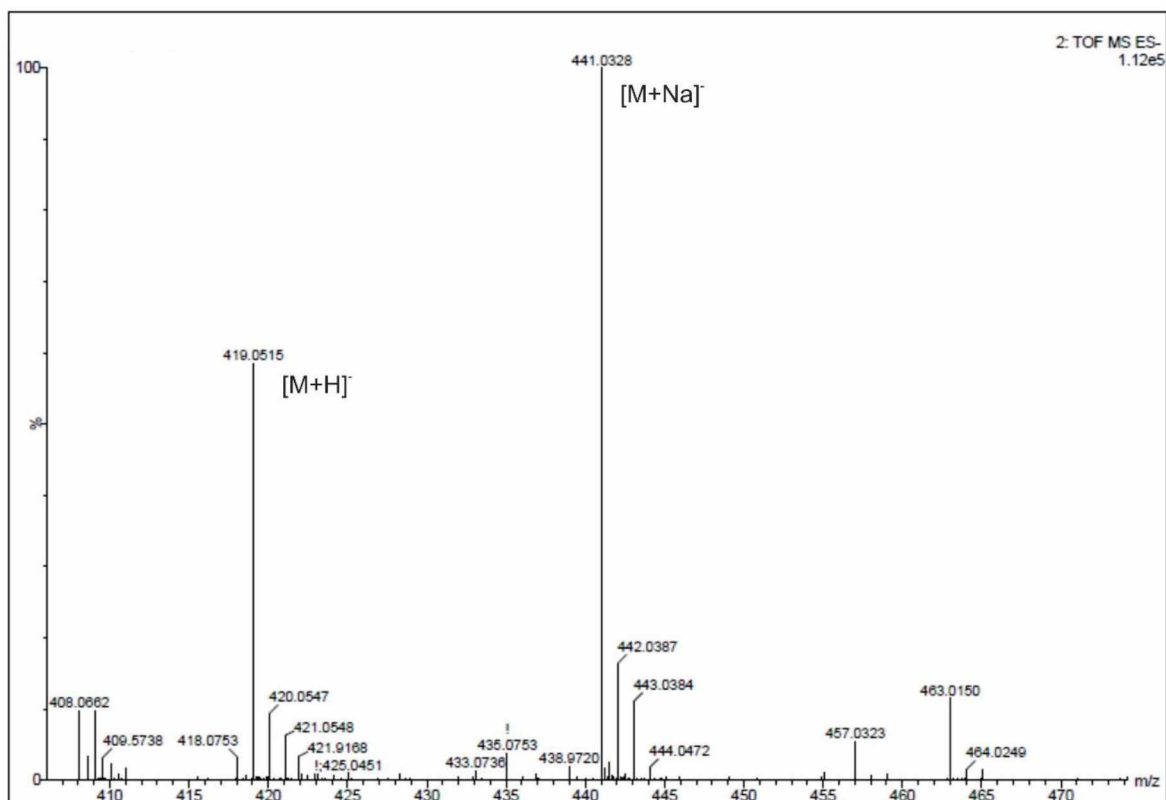
LEGENDA:^a Deslocamentos químicos (ppm) obtidos dos espectros de HSQC editado.

^b O código de letras foi baseado na nomenclatura descrita na literatura (KNUTSEN et al., 1994; SANTOS et al., 2019). GU4S e DA correspondem a β -D-GalAp 4-sulfato e 3,6-AnGalOH, respectivamente.

^c Os números referem-se aos carbonos ou hidrogênios nas unidades monossacarídicas.

Por fim, o dissacarídeo alditol foi submetido a análise de ESI-MS. Na FIGURA 40 é apresentado um espectro em modo negativo, onde observa-se principalmente 2 íons, o primeiro com m/z 419,0 $[\text{M}+\text{H}]^-$ e o segundo com m/z 441,0 $[\text{M}+\text{Na}]^-$, confirmando a estrutura do dissacarídeo β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol.

FIGURA 40 - ESPECTROS DE ESI-MS (MODO NEGATIVO) DA FRAÇÃO KOHR II colocar desenho

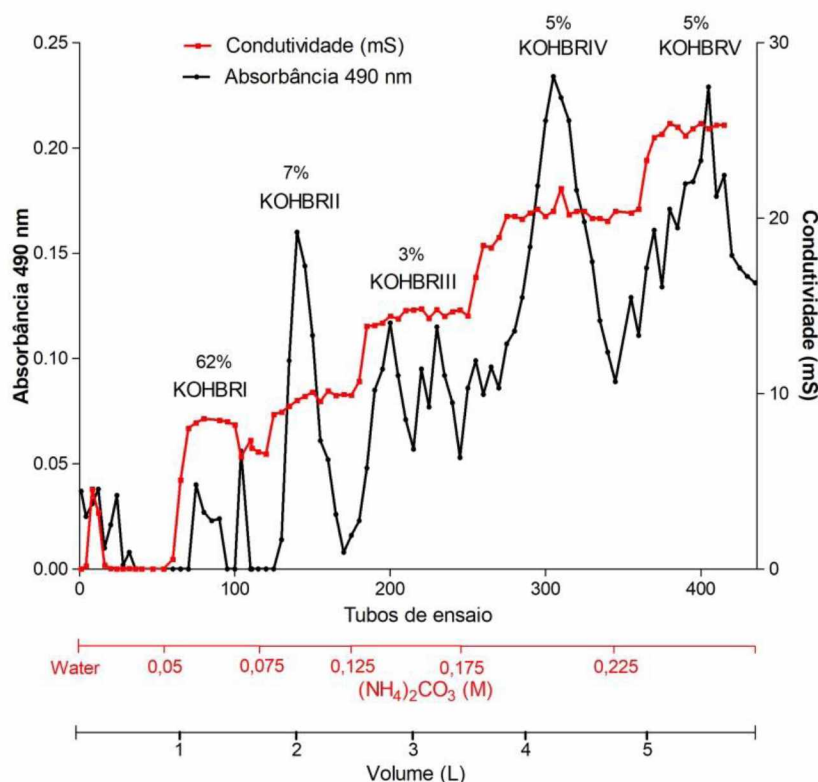


FONTE: O autor (2019).

4.3.4 Purificação de KOhr e caracterização dos oligossacarídeos alditóis isolados.

A mistura de oligossacarídeos alditóis KOHR foi obtida a partir da hidrólise de KO em escala preparativa à 65 °C por 5 h (FIGURA 34). Para sua purificação foi utilizada a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE–Sephadex. Da mesma forma que para a purificação de KOhr, a eluição foi realizada inicialmente com água destilada e, em seguida, com diferentes concentrações molares de carbonato de amônio– 0,05 mol/L; 0,075 mol/L; 0,100 mol/L; 0,125 mol/L; 0,150 mol/L; 0,175 mol/L e 0,225 mol/L. A presença de carboidratos foi detectada conforme descrito por Dubois e colaboradores (1956) e a força iônica por condutímetro. O perfil de eluição cromatográfico de KOhr está apresentado na FIGURA 41, respectivamente.

FIGURA 41 - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO KOHbr.



FONTE: O autor (2019).

Na FIGURA 41 observa-se o cromatograma da amostra KOHbr, em que foram eluidos picos nas concentrações de carbonato de amônio: 0,05 (KOHBRI), 0,075 (KOHBRII), 0,125 (KOHBRIII), 0,175 (KOHBRIV) e 0,225 mol/L (KOHBRV). Os tubos de ensaio foram agrupados da seguinte maneira:

- tubos de ensaio 73-90 (KOHBRI);
- tubos de ensaio 133-160 (KOHBRII);
- tubos de ensaio 190-235 (KOHBRIII);
- tubos de ensaio 275-340 (KOHBRIV);
- tubos de ensaio 370-420 (KOHBRV).

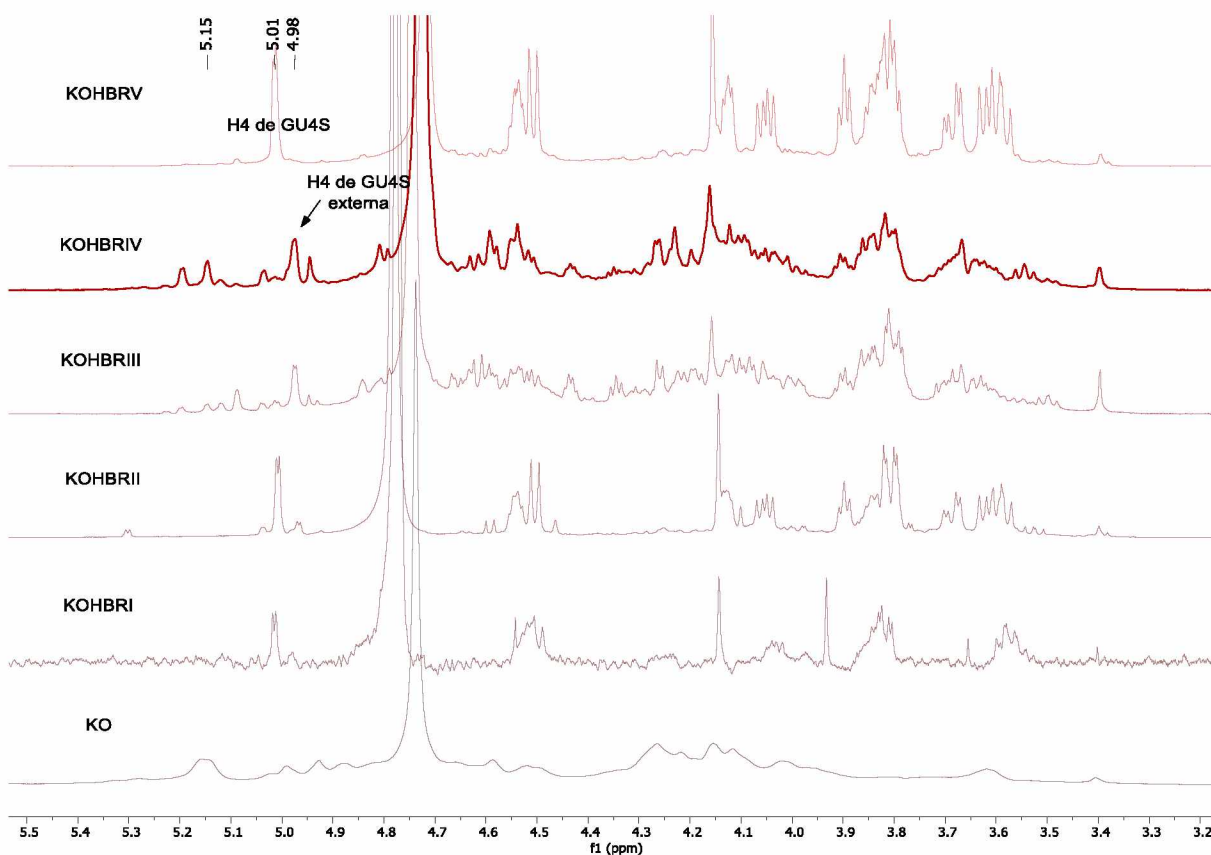
Após as frações resultantes serem rotaevaporadas extensivamente com água para eliminação do carbonato de amônio e liofilizadas, foi obtido os seguintes rendimentos 62 %, 7 %, 3 %, 5 % e 5 %.

Em seguida, as frações foram solubilizadas em água destilada na concentração de 2 mg/mL e submetidas à cromatografia de exclusão em coluna Bio-

Gel P-2. A eluição foi realizada com água destilada, sendo utilizadas as mesmas formas de detecção empregados na coluna de troca aniônica.

As frações resultantes liofilizadas foram submetidas ao tratamento com resina trocadora de cátions na forma de íons sódio (Na^+), e então caracterizadas por RMN de ^1H .

FIGURA 42 - ESPECTROS DE RMN ^1H DAS AMOSTRAS KOHBRI, KOHBRII, KOHBRIII, KOHBRIV E KOHBRV



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectros realizados em 500 MHz, 25 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm) após purificação por cromatografia de troca iônica e exclusão de tamanho, e troca catiônica.

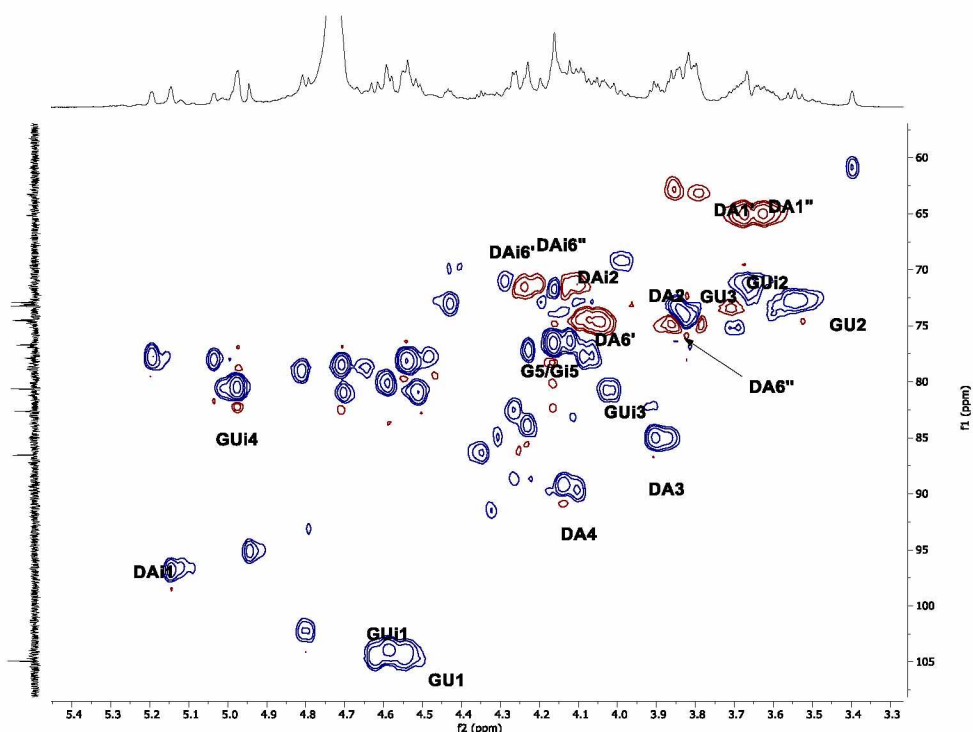
A FIGURA 42 apresenta os espectros de RMN de ^1H das frações KOHBRI, KOHBRII, KOHBRIII, KOHBRIV e KOHBRV. As frações KOHBRI, KOHBRII e KOHBRV, apresentaram os espectros similares aos espectros de ^1H de KOHRI e KOHRII (FIGURA 38), indicando serem constituídas principalmente pelo dissacarídeo $\beta\text{-D-GalAp-4- sulfato-(1}\rightarrow\text{4)-3,6-anidro-D-galactitol}$.

É possível observar nas frações KOHBRIII e KOHBRIV o sinal em 5,15 ppm atribuído a H4 da unidade $\beta\text{-D-galactopiranosidurônico 4-sulfato}$ e H1 da unidade

3,6-anidro- α -D-galactopiranosose quando estas unidades estão em ligação α -(1 \rightarrow 3). Além deste, observa-se o sinal em 4,98 ppm correspondente ao H4 da unidade de β -D-GalAp 4-sulfato externa, sugerindo que existe moléculas com maior grau de polimerização. Para KOHBRIV, se os sinais em 5,15 e 4,98 ppm forem integrados, a relação será em torno de 1:1, sugerindo a presença do tetrassacarídeo β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol. Entretanto, são observados sinais adicionais na região de 4,90 a 5,25 ppm, indicando que o tetrassacarídeo alditol não está puro.

Como o sinal em 5,15 ppm é maior na fração KOHBRIV do que na KOHBRIII, o que indica mais ligações α -(1 \rightarrow 3), KOHBRIV foi selecionada para dar continuidade na caracterização. Assim, na FIGURA 43 é apresentado o RMN bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC da fração KOHBRIV.

FIGURA 43 - MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DE KOHBRIV.



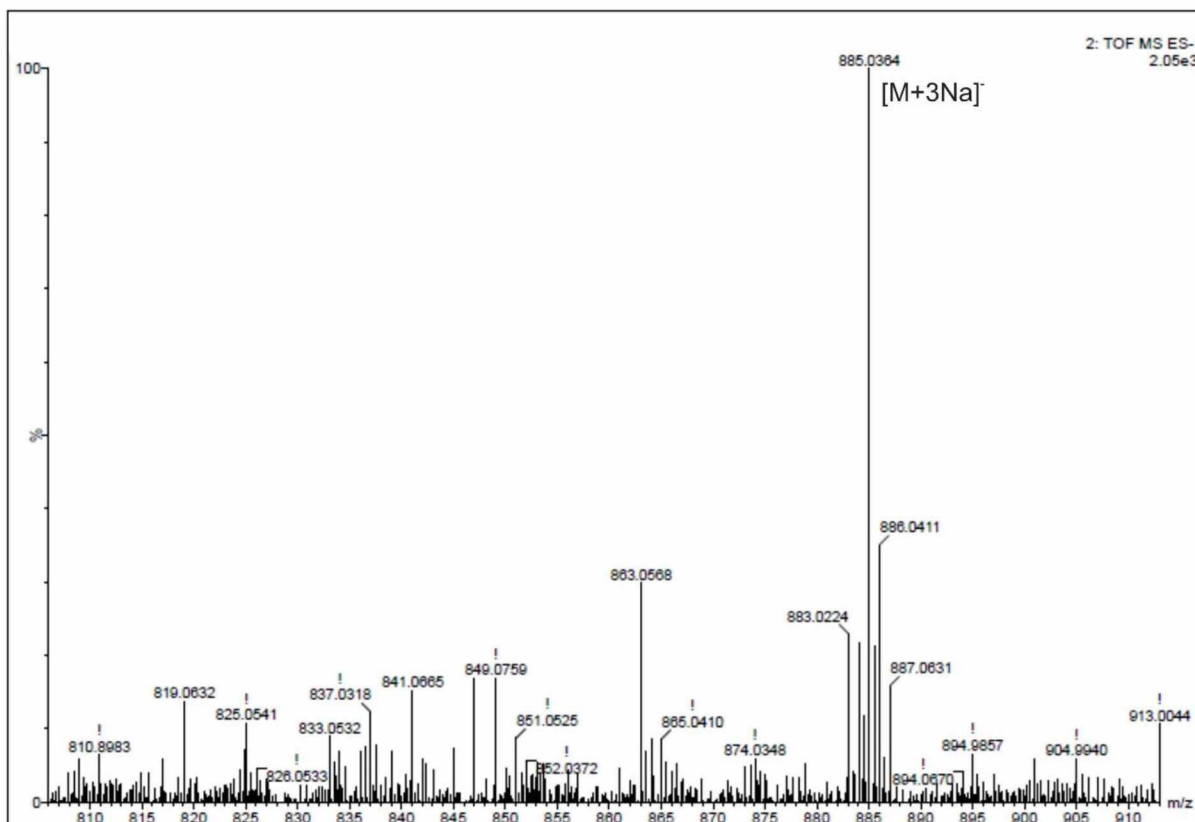
LEGENDA: Espectros adquiridos em 500 MHz, 25 °C em D₂O, acetona como padrão interno (δ = 2,208 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C). GU, GUI, DAI e DA correspondem a β -D-GalAp 4-sulfato, β -D-GalAp interna, 3,6-AnGalp interna e 3,6-AnGalOH, respectivamente.

A FIGURA 43 apresenta o mapa de correlação bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC editado da fração KOHBRIV. Em vermelho estão representados os grupos CH₂ em fase oposta a grupos CH e CH₃. Assim, pode-se observar em 64,9/3,68 ppm e

64,9/3,63 ppm as correlações atribuídas a DA1'/H1 externa, em 4,24/71,5 ppm e 4,11/71,5 ppm as correlações de DAi6'/H6 e DAi6''/H6 internas e em 4,06/74,6 ppm e 3,85/74,6 ppm correspondentes a DA6'/H6 e DA6''/H6 externa. Na região anomérica, observa-se duas correlações para GU, em 104,4/4,56 ppm correspondentes a GU4S1/H1 externa e em 104,4/4,62 ppm atribuídos a GU4Si1/H1 interna. Essas correlações indicam que existe unidades 3,6-anidro- α -D-GalAp ligadas, atribuídas ao tetrassacarídeo como principal constituinte.

A fração KOHBRIV foi submetida a análise de ESI-MS. Na FIGURA 44 é apresentado um espectro em modo negativo, onde observa-se principalmente um íon com m/z 885,0 $[M+3Na]^-$, confirmando a presença do tetrassacarídeo β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol.

FIGURA 44 - ESPECTROS DE ESI-MS (MODO NEGATIVO) DA FRAÇÃO KOHBRIV

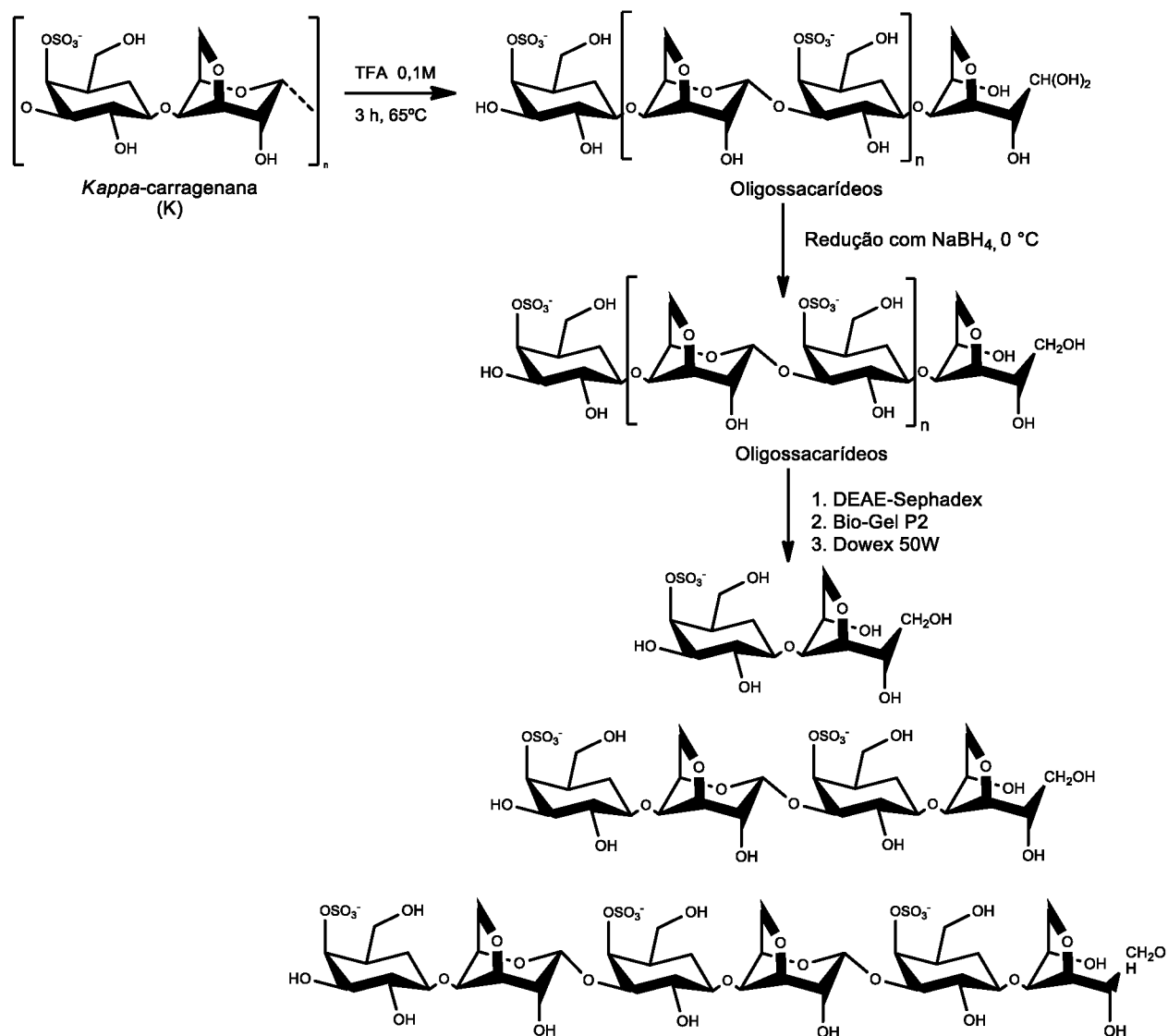


FONTE: O autor (2019).

4.3.5 Produção de oligossacarídeos alditóis a partir de κ-carragenana (K)

A fim de se obter os oligossacarídeos alditóis a partir da κ-carragenana nativa foi realizada a hidrólise ácida parcial da fração K conforme descrito anteriormente (FIGUEIREDO, 2013). Para isso, a amostra K foi hidrolisada com TFA 0,1 mol/L, em estufa a 65 °C por 3 h. O ácido presente no meio da reação foi removido através de co-destilação com tolueno em pressão reduzida e após a liofilização foi obtida a fração Kh, com rendimento de 98,4 %. Esta metodologia promove a hidrólise das ligações 3,6-anidro-α-galactopiranosídicas, devido a maior labilidade destas, gerando terminais de anidrogalactose na forma de aldeído hidratado (FIGURA 45).

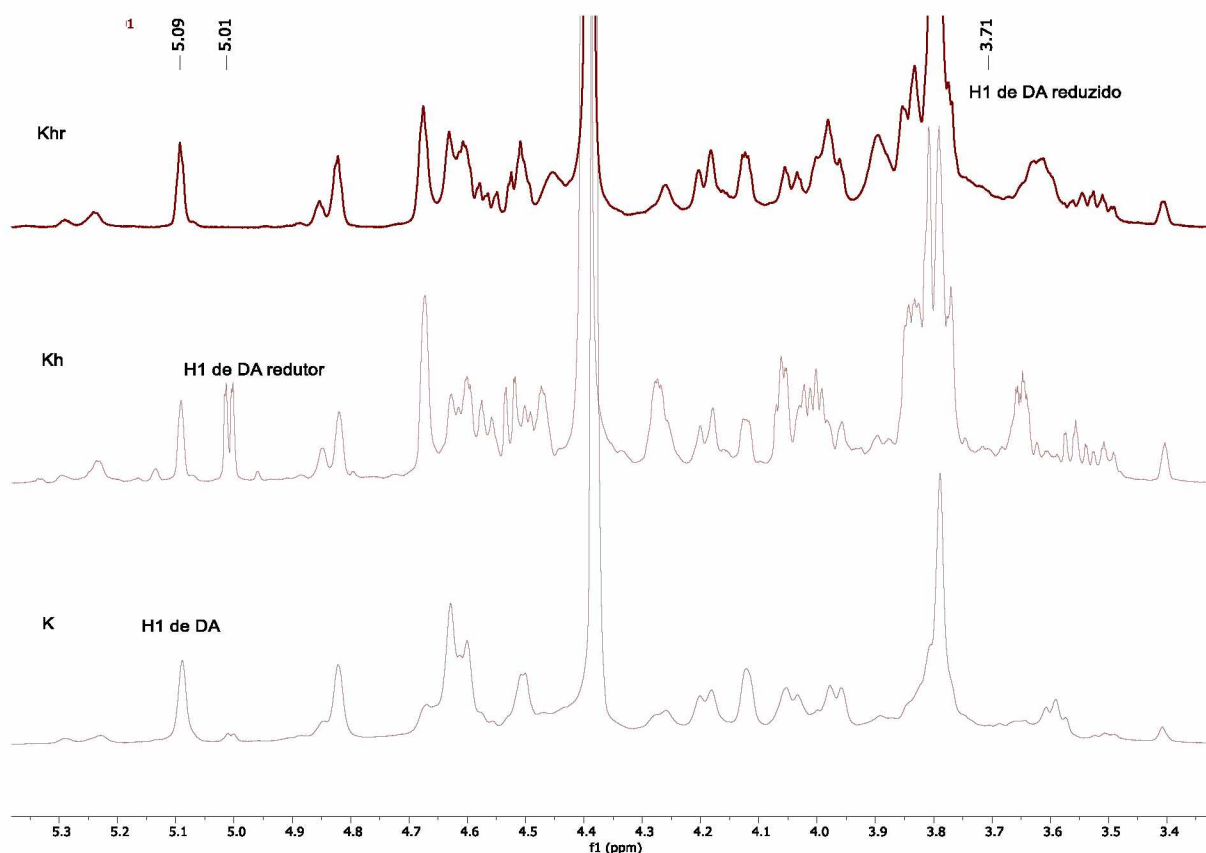
FIGURA 45 - PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS VIA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA AMOSTRA K.



FONTE: O autor (2019).

Análises de RMN de ^1H da amostra K e Kh (FIGURA 46) confirmaram o sucesso da hidrólise.

FIGURA 46 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES K, Kh E Khr.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectros realizados em 500 MHz, 60 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).

A FIGURA 46 apresenta o espectro de RMN de ^1H da fração K que possui κ -carragenana como principal constituinte. Assim, observa-se sinais característicos desta galactana como o sinal em 5,09 ppm, correspondente ao H-1 de 3,6-An- α -D-Galp (USOV, 1984). No espectro de Kh, após a hidrólise, foi observado o sinal em 5,01 ppm, que corresponde ao H1 da unidade redutora de 3,6-An- α -D-galactose (DUCATTI et al., 2011), confirmando a hidrólise das ligações 3,6-anidrogallactopiranosídicas.

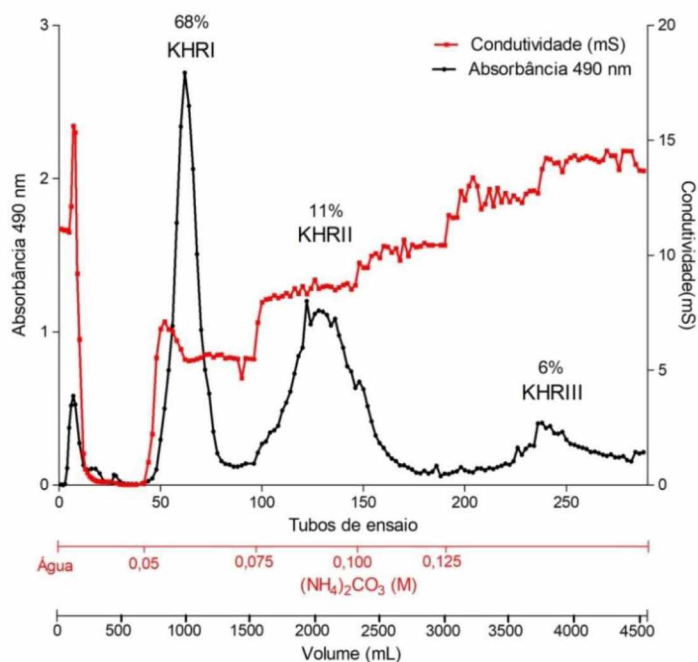
Para a redução das unidades de aldeído hidratado para sua forma alditol, a fração Kh foi reduzida com NaBH_4 em banho de gelo por 4 h. Em seguida, procedeu-se à evaporação da mistura em pressão reduzida seguida de liofilização, sendo gerada a fração Khr.

Para confirmar a redução dos terminais redutores, foi realizada a análise de RMN de ^1H da fração Khr. Na FIGURA 46, observa-se o deslocamento do sinal em 5,01 ppm (H-1 da unidade 3,6-anidrogactose) para 3,71 ppm (H-1 da unidade alditol), confirmando a redução das unidades 3,6-anidrogactose hidratadas para 3,6-anidrogactitol.

4.3.6 Purificação e caracterização dos oligossacarídeos alditóis derivados de κ -carragenana

As misturas de oligossacarídeos alditóis preparadas em escala preparativa Khr (FIGURA 45), foram purificadas utilizando a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE–Sephadex. A eluição foi realizada inicialmente com água destilada e, em seguida, com diferentes concentrações molares de carbonato de amônio – 0,05 mol/L; 0,075 mol/L; 0,100 mol/L; 0,125 mol/L; 0,150 mol/L; 0,175 mol/L e 0,225 mol/L. A presença de carboidratos foi detectada conforme descrito por Dubois e colaboradores (1956) e a concentração de íons em solução foi monitorada indiretamente medindo-se a condutividade. O perfil de eluição cromatográfico está apresentado na FIGURA 47.

FIGURA 47 - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO Khr.



FONTE: O autor (2019).

Na FIGURA 47 observa-se o perfil de eluição da amostra Khr com três picos definidos (KHRI, KHRII e KHRIII) para as seguintes concentrações de carbonato de amônio: 0,05; 0,075 e 0,125 mol/L, respectivamente. As frações eluídas com carbonato de amônio nas concentrações 0,100 e 0,150 mol/L foram descartadas por não apresentarem quantidades significativas de carboidratos.

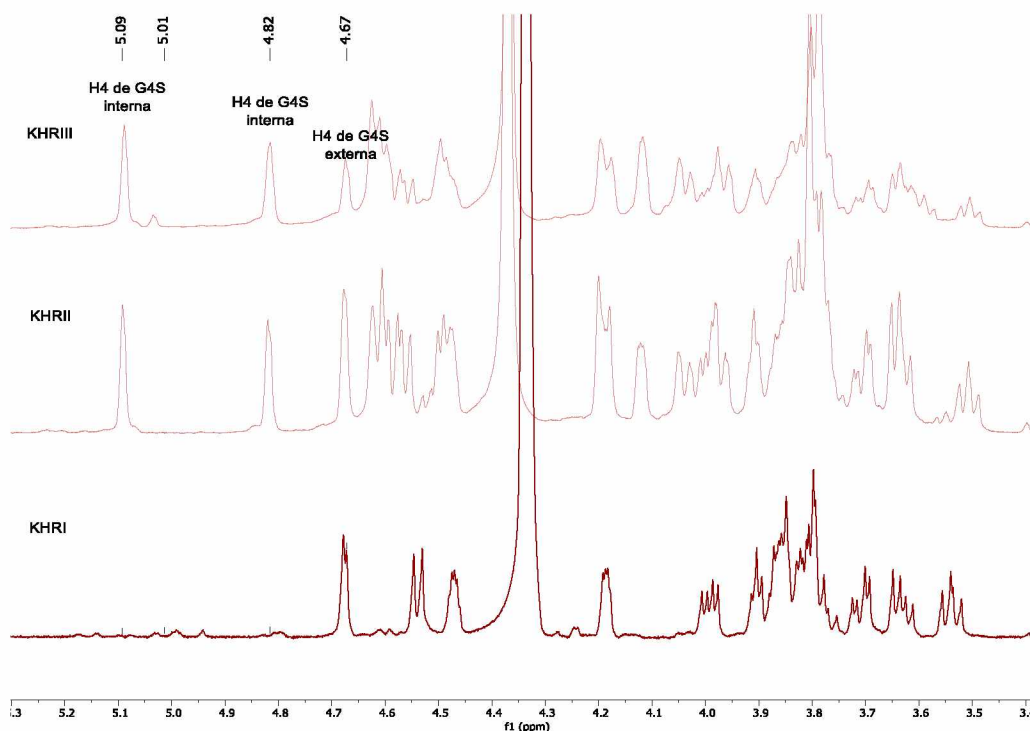
Cada pico oriundo da cromatografia foi agrupado, rotaevaporado, liofilizado, originando as frações KHRI, KHRII e KHRIII. Os rendimentos das frações foram 68 %, 11 % e 6 %, respectivamente, de acordo com o relatado por Figueiredo (2013).

Para dessalinização e eliminação de subprodutos ainda presentes, as frações liofilizadas KHRI, KHRII e KHRIII foram solubilizadas em água destilada e submetidas à cromatografia de exclusão em coluna Bio-Gel P-2. A eluição foi realizada com água destilada. Para detecção de carboidratos e do sal, foram utilizados os mesmos métodos empregados na coluna de troca iônica.

Em seguida, as frações KHRI, KHRII e KHRIII dessalinizadas foram submetidas ao tratamento com a resina trocadora de cátions Dowex 50w x8 na forma de íons sódio (Na^+), para substituir o contra íon amônio (NH_4^+) pelo Na^+ . As subfrações KHRI, KHRII e KHRIII foram caracterizadas por RMN de ^1H e ^{13}C .

A FIGURA 48 apresenta o RMN de ^1H das subfrações KHRI, KHRII e KHRIII. Para a fração KHRI foi observado um espectro semelhante ao descrito por Figueiredo (2013) para o dissacarídeo alditol carrabitol 4²-sulfato. O sinal em 4,67 ppm corresponde ao H4 da unidade de β -D-galactopiranosose 4-sulfato, indicando presença do grupo sulfato após a hidrólise. Para a fração KHRII, foram observados os sinais em 4,67, 4,82 e 5,09 ppm correspondentes respectivamente ao H4 da unidade β -D-galactopiranosose 4-sulfato externa, H4 da unidade β -D-galactopiranosose 4-sulfato interna e H1 da unidade de 3,6-anidro- α -galactopiranosose interna na mesma proporção, indicando a presença do tetrassacarídeo alditol, carratetraitol 4²,4⁴-dissulfato (GONÇALVES, 2005).

FIGURA 48 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS SUBFRAÇÕES KHRI, KHRII E KHRIII



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Espectros realizados em 500 MHz, 60 °C em D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm) após purificação por cromatografia de troca iônica e exclusão de tamanho, e troca catiônica.

Os mesmos sinais estão presentes na fração KHRIII, porém, a integração dos sinais referentes a estes prótons segue à relação 1:2:2 devido à presença de uma unidade β -D-galactopiranosose 4-sulfato externa, duas unidades β -D-galactopiranosose 4-sulfato internas e duas unidades 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose internas, indicando a presença do hexassacarídeo carrahexaitol 4²,4⁴,4⁶- trissulfato, conforme descrito por Figueiredo (2013).

FIGURA 49 - MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DAS SUBFRAÇÕES KHRI (a), KHRII (b) E KHRIII (c).

(continua)

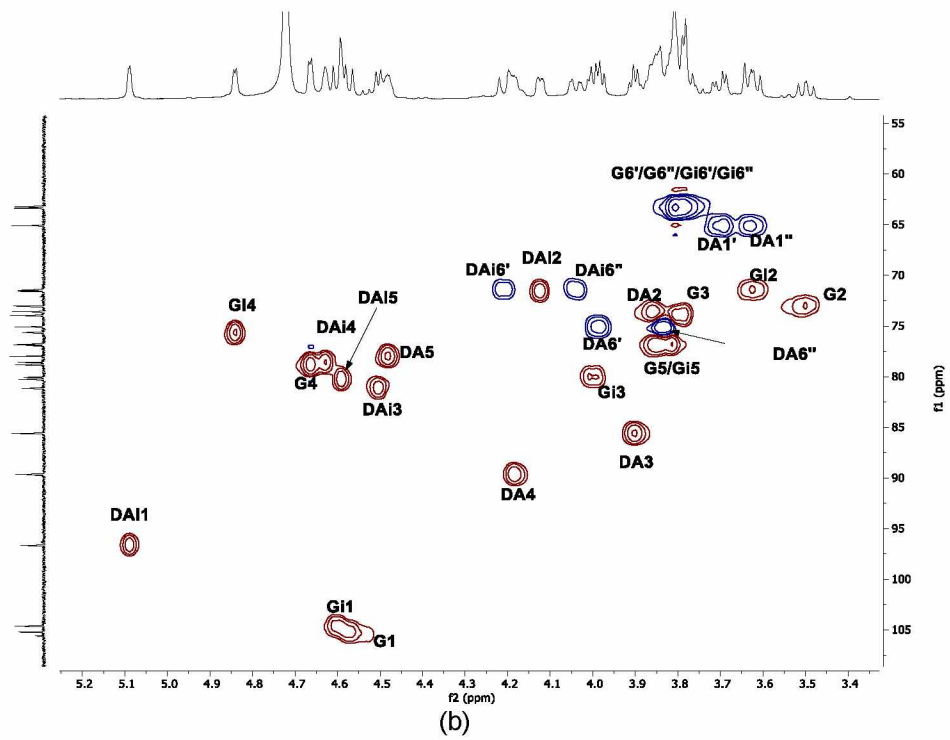
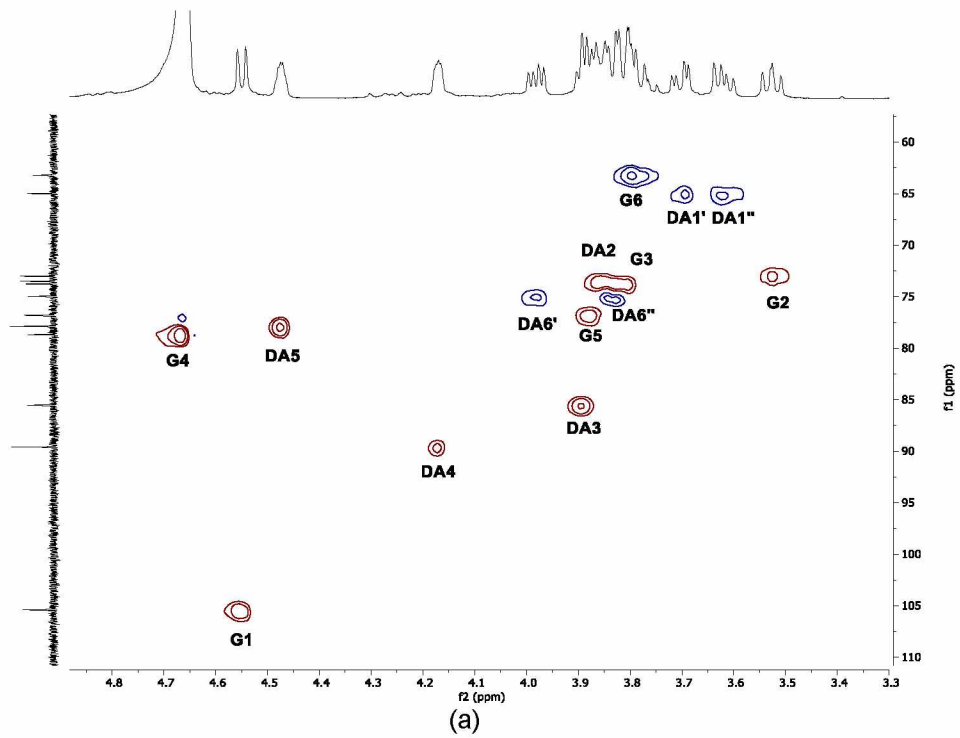
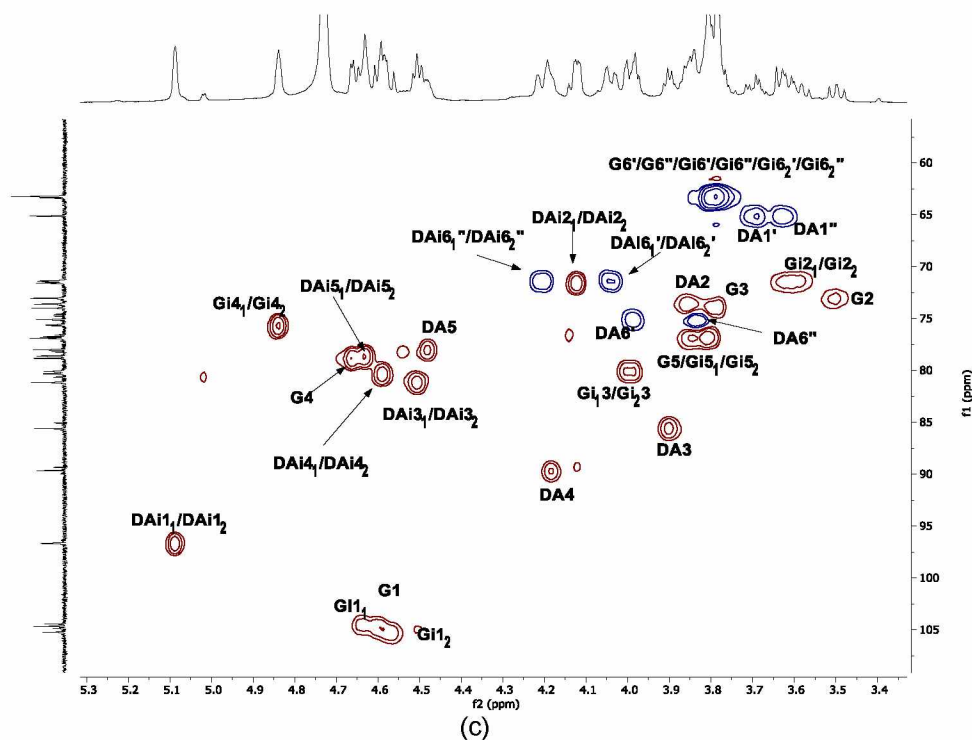


FIGURA 49 - MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC EDITADO

(conclusão)



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Mapas de correlação obtidos em 500 MHz, 25 °C em D₂O, acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e 32,69 ppm para ¹H e ¹³C) após purificação por cromatografia de troca iônica e exclusão de tamanho, e troca catiônica. **G**, **Gi**, **DAi** e **DA** correspondem a β -D-Galp externa, β -D-Galp interna, 3,6-AnGalp interna e 3,6-AnGalOH, respectivamente.

Os assinalamentos apresentados na TABELA 10 foram obtidos dos espectros de ¹H-¹³C HSQC das subfrações KHRI, KHRII e KHRIII (FIGURA 49) por comparação aos descritos na literatura para os mesmos oligossacarídeos alditóis de κ -carragenana (FIGUEIREDO, 2013).

TABELA 10 - ASSINALAMENTOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DOS OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS OBTIDOS A PARTIR DA κ -CARRAGENANA

Amostra	Unidade	Átomo ^a	Posição ^c							
			1'	1''	2	3	4	5	6'	6''
KHRI carrabitol 4 ² – sulfato	β -D-Galp (ext.) G^b	^1H	4,56	-	3,53	3,83	4,67	3,88	3,80	3,80
		^{13}C	105,5	-	73,1	73,8	78,8	76,8	63,2	63,2
	3,6-An- α -Gal-OH DA	^1H	3,69	3,62	3,86	3,89	4,17	4,48	3,98	3,84
		^{13}C	65,1	65,1	73,5	85,6	89,7	78,0	75,1	75,1
KHRII carratetraitol 4 ² ,4 ⁴ – dissulfato	β -D-Galp (ext.) G	^1H	4,58	-	3,50	3,79	4,66	3,85	3,81	3,81
		^{13}C	105,1	-	73,0	73,9	78,9	76,8	63,3	63,3
	3,6-An- α -Galp (int.) DAi	^1H	5,09	-	4,12	4,50	4,63	4,59	4,22	4,04
		^{13}C	96,6	-	71,5	81,1	78,6	80,2	71,4	71,4
	β -D-Galp (int.) Gi	^1H	4,59	-	3,63	4,01	4,84	3,81	3,81	3,81
		^{13}C	104,9	-	71,4	80,0	75,6	76,8	63,3	63,3
	3,6-An- α -Gal-OH DA	^1H	3,69	3,63	3,86	3,90	4,18	4,48	3,98	3,84
		^{13}C	65,1	65,1	73,6	85,6	89,6	78,0	75,1	75,1
KHRIII carrahexaitol 4 ² ,4 ⁴ ,4 ⁴ – trissulfato	β -D-Galp (ext.) G	^1H	4,59	-	3,50	3,78	4,66	3,84	3,79	3,79
		^{13}C	104,9	-	73,1	73,9	78,8	76,9	63,3	63,3
	3,6-An- α -Galp (int.) DAi₁	^1H	5,09	-	4,12	4,51	4,59	4,63	4,20	4,04
		^{13}C	96,7	-	71,6	81,2	80,4	78,7	71,4	71,4
	β -D-Galp (int.) Gi₁	^1H	4,59	-	3,61	4,00	4,84	3,81	3,79	3,79
		^{13}C	104,8	-	71,4	80,1	75,7	76,9	63,3	63,3
	3,6-An- α -Galp (int.) DAi₂	^1H	5,09	-	4,12	4,51	4,59	4,63	4,20	4,04
		^{13}C	96,7	-	71,6	81,2	80,4	78,7	71,4	71,4
	β -D-Galp (int.) ² Gi₂	^1H	4,59	-	3,61	4,00	4,84	3,81	3,79	3,79
		^{13}C	104,8	-	71,4	80,1	75,7	76,9	63,3	63,3
	3,6-An- α -Gal-OH DA	^1H	3,63	3,69	3,86	3,90	4,18	4,48	3,99	3,84
		^{13}C	65,2	65,2	73,6	85,6	89,7	78,03	75,1	75,2

FONTE: O autor (2019).

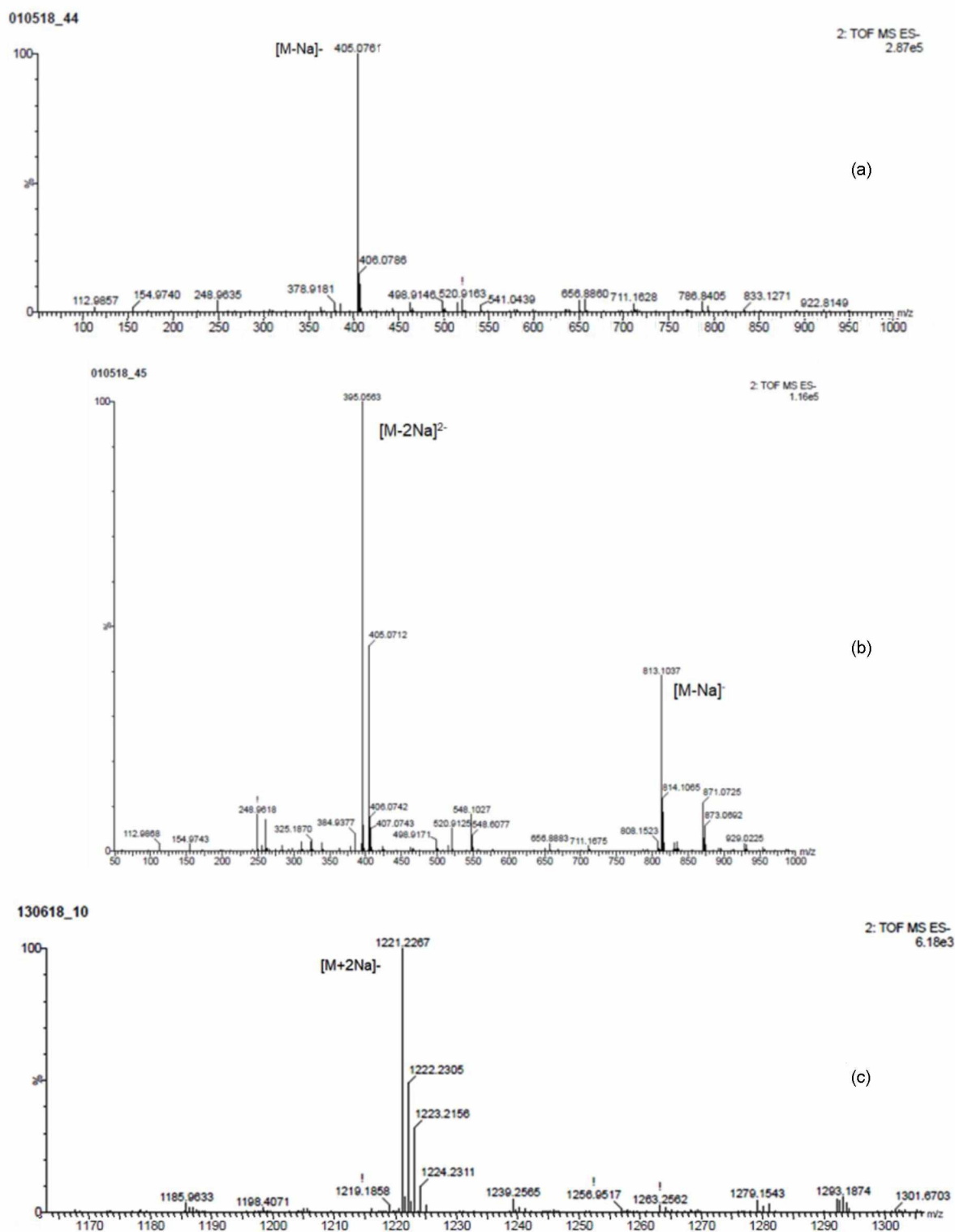
LEGENDA:^a Deslocamentos químicos (ppm) obtidos dos espectros de HSQC editado.

^b O código de letras foi baseado na nomenclatura descrita na literatura (KNUTSEN et al., 1994). G, Gi, DAi e DA correspondem a β -D-Galp externa, β -D-Galp interna, 3,6-AnGalp interna e 3,6-AnGalOH, respectivamente.

^c Os números referem-se aos carbonos ou hidrogênios nas unidades galactosil and 3,6-anidro-galactosil.

Os principais espectros de ESI-MS das subfrações KHRI, KHRII e KHRIII em modo negativo estão representados na FIGURA 50.

FIGURA 50 - ESPECTROS DE ESI-MS (MODO NEGATIVO) DAS FRAÇÕES KHRI (a), KHRII (b) E KHRIII (c).



FONTE: O autor (2019).

Na FIGURA 50a foi observado um principal íon com m/z 405,0 $[M-Na]^-$ corroborando com a estrutura proposta para o carrabiitol 4² – sulfato. Três principais íons foram observados na FIGURA 50b, m/z 395,1 $[M-2Na]^{2-}$, 405,08 $[M-Na]^-$ e 813,1 $[M-Na]^-$ compatíveis com o tetrassacarídeo alditol dissulfatado carratetraitol 4²,4⁴– dissulfato. O íon com m/z 1221,2 $[M+2Na]^-$ foi observado na FIGURA 50c corroborando com a estrutura do carrahexaitol 4²,4⁴,4⁴– trissulfato.

5 CONCLUSÕES

Kappa-carragenana foi oxidada seletivamente em C6 com sucesso, utilizando os reagentes TEMPO e TCCA.

A análise comparativa da atividade anticoagulante de diferentes carragenanas C6 oxidadas com diferentes graus de oxidação mostrou que:

- Os produtos oxidados apresentaram maior atividade anticoagulante que os seus respectivos polissacarídeos nativos, com exceção das carragenanas *iota* e *iota/nu*;
- O efeito sinérgico dos grupos carboxila é dependente da regioquímica dos grupos sulfatos. Neste aspecto, grupos sulfato em C2 de unidades β -D-GalAp apresentaram maior atividade anticoagulante;
- K-carragenana com oxidação parcial apresentou maior atividade anticoagulante em comparação ao polissacarídeo completamente oxidado em C6 das unidades β -D-GalAp.

A análise reológica dinâmica oscilatória da κ -carragenana (K) e do derivado semi-sintético de κ -carragenana contendo unidades de β -D-GalAp (KO) mostrou que:

- A carboxila em C6 na estrutura da κ -carragenana não contribuiu para a gelificação;
- A adição dos íons K^+ na concentração de 1 mol/L promoveu na κ -carragenana nativa a capacidade de formar um gel mais forte que nas concentrações de 0,1 e 0,5 mol/L;
- A concentração de 0,5 mol/L de K^+ foi a única a preservar a estrutura de gel da κ -carragenana nativa após a rampa de temperatura.

As análises microestruturais de K e KO na presença de KCl mostrou que ambos polissacarídeos são semelhantes no padrão de polimerização do filme formado, mas o filme constituído por KO se apresentou menos denso e mais quebradiço.

Kappa-carragenana e *kappa*-carragenana oxidada foram hidrolisadas parcialmente com TFA com sucesso.

A purificação dos produtos da hidrólise ácida parcial por meio da cromatografia de troca aniônica e exclusão de tamanho foi eficiente para purificar e

separar três oligossacarídeos de tamanhos diferentes obtidos a partir da κ -carragenana, e um dissacarídeo a partir da κ -carragenana oxidada, sendo estes:

- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol (carrabitol 4²-sulfato),
- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol (carratetraitol 4², 4⁴-dissulfato)
- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol (carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato).
- β -D-GalAp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol, obtido a partir da *kappa*-carragenana oxidada.

Esse trabalho mostrou o grande potencial para as carragenanas oxidadas e abriu perspectivas em relação aos derivados oxidados na atividade anticoagulante, na comparação inédita das propriedades viscoelásticas e microestruturais de κ -carragenana e κ -carragenana oxidada e, nas diversas atividades biológicas as quais os oligossacarídeos alditóis podem ser testados, como antitumorais, antivirais, antiangiogênicos e anti-inflamatórios.

REFERÊNCIAS

ABAD, L. V. et al. Radiation degradation studies of carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p.100–106, 2009.

ABAD, L. V. et al. Radiolysis studies of aqueous κ -carrageenan. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 268, p. 1607–1612, 2010.

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

AL NAHAIN, A. et al. Heparin mimetics with anticoagulant activity. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, p. 1582–1613, 2018.

ALVES, M. G. C. F et al. Extraction process optimization of sulfated galactan-rich fractions from *Hypnea musciformis* in order to obtain antioxidant, anticoagulant, or immunomodulatory polysaccharides. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 1931–1942, 2016.

ARATA, P. X. et al. Novel sulfated xylogalactoarabinans from green seaweed *Cladophora falklandica*: chemical structure and action on the fibrin network. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 139–150, 2016.

ARAÚJO, C. A. et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–91, 2013.

ASPINALL, G. O. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In: __. **The polysaccharides**, v. 1. New York: Academic Press, p. 100-124, 1982.

BAE, I. Y. et al. Effect of sulfation on the physicochemical and biological properties of citrus pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1980-1983, 2009.

BASU, N. et al. Trichloroisocyanuric acid (TCCA):an efficient green reagent for activation of thioglycosides toward hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v. 369, p. 10–13, 2013.

BRAGD, P. L. et al. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: survey of methods and applications. **Topics in Catalysis**, v. 27, n. 1-4, p.49-66, 2004.

BUCK, C. B. et al. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 7, p. 671–680, 2006.

BUI, V. T. N. T. et al. Rheology and microstructure of mixtures of iota and ι-carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 180–187, 2019a.

BUI, V. T. N. T. et al. Structure and rheological properties of carrageenans extracted from different red algae species cultivated in Cam Ranh Bay, Vietnam. **Journal of Applied Phycology**, 31, p. 1947–1953, 2019b.

CALVO, G. H. et al. Disaccharides obtained from carrageenans as potential antitumor agents. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6654, p. 1-13, 2019.

CAO, X; SHOICHET, M. S. Photoimmobilization of biomolecules within a 3-dimensional hydrogel matrix. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 13, n. 6, p. 623–636, 2002.

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

CHATTAWAY, F. D.; WADMORE, J. M. The constitution of hydrocyanic, cyanic, and cyanuric acids, **Journal of the Chemical Society, Transactions**, p. 1045–1051, 1989.

CHEN, Y.; LIAO, M.; DUNSTAN, D. E. The rheology of K⁺-κ-carrageenan as a weak gel. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 109–116, 2002.

CIANCIA, M. et al. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. **Carbohydrate Polymers**, v. 20, p. 95–98, 1993.

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

COSENZA, V. A. et al. Partial and total C-6 oxidation of gelling carrageenans. Modulation of the antiviral activity with the anionic character. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 199–206, 2015.

CURRY, A. N. G.; PIERCE, J. M. T. Conventional and near-patient tests of coagulation. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 7, n. 2, p. 45-50, 2007.

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

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 389–395, 1997.

DE S.F-TISCHER, P. et al. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 4, p. 459–465, 2006.

DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and nonenzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**, London, v. 78, p. 312-319, 1961.

DODGSON, K.S; PRINCE, R. G. A note on the determination of the Ester sulphate content f sulphated polysaccharide. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determiation of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28, p. 350-356, 1956.

DUCATTI, D. R. B. et al. Production of agaro- and- carraoligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 296–304, 2011.

ESTEVEZ, M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2575–2592, 2004.

EVAGELIOU, V. I.; RYAN, P. M.; MORRIS, E. R. Effect of monovalent cations on calcium-induced assemblies of kappa-carrageenan. **Food hydrocolloids**, v. 86, p. 141–145, 2019.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H. Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 252, p. 171–182, 1994.

FAN, L. H. et al. Synthesis and anticoagulant activity of pectin sulfates. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 2171–2178, 2012.

FEDOROV, S. N. et al. Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: some results and prospects. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4876–4901 2013.

FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento de um método por eletroforese capilar para quantificação e identificação de oligossacarídeos sulfatados**. Curitiba: Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 79 p., 2013.

FIGUEIREDO, D. B. et al. Monitoring of κ -carrageenan depolymerization by capillary electrophoresis and semisynthesis of oligosaccharide alditols. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, 152–160, 2019.

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

FORGET, A. et al. Polysaccharide hydrogels with tunable stiffness and provasculogenic properties via α -helix to β -sheet switch in secondary structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 12887–12892, 2013.

GABRIELE, A.; SPYROPOULOS, F.; NORTON, I. T. Kinetic study of fluid gel formation and viscoelastic response with kappa-carrageenan. **Food Hydrocolloids**, 23, p. 2054–2061, 2009.

GEONZON, L. C.; BACABAC, R. G.; MATSUKAWA, S. Network structure and gelation mechanism of kappa and iota carrageenan elucidated by multiple particle tracking. **Food Hydrocolloids**, v. 92, p. 173–180, 2019.

GHANBARZADEH, M.; GOLMORADIZADEH, A.; HOMAEI, A. Carrageenans and carrageenases: versatile polysaccharides and promising marine enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 3, p. 535–571, 2018.

GLAUSER, B. F. et al. Anticoagulant activity of a sulfated galactan: Serpin-independent effect and specific interaction with factor Xa. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, p. 1183-1193, 2009.

GONÇALVES, A. G. et al. Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2123–2134, 2005.

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

GREER, C. W.; YAPHE, W. Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodanhyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 27, p. 473–478, 1984.

GROULT, H. et al. λ-Carrageenan oligosaccharides of distinct anti-heparanase and anticoagulant activities inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell migration. **Marine Drugs**, v. 3, n. 140, 2019.

HASSAN, R. M. et al. Kinetics and mechanism of permanganate oxidation of iota- and lambda-carrageenan polysaccharides as sulfated carbohydrates in acid perchlorate solutions. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 14, p. 2260–2267, 2011.

HASSAN, R. M. et al. Acid-catalyzed oxidation of some sulfated polysaccharides Kinetics and mechanism of oxidation of kappa-carrageenan by cerium(IV) in aqueous perchlorate solutions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 332, p. 138–144, 2010.

HERMANSSON, A.; ERIKSSON, E.; JORDANSSON, E. Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 297–320, 1991.

HOFFMANN, R.; RUSSELL, A.; GIDLEY, M. Molecular weight distribution of carrageenans: characterisation of commercial stabilisers and effect of cation depletion on depolymerisation. **Gums and stabilisers for the food industry**, v. 8, p. 137–150, 1995.

JAYAKUMAR, G. C. et al. Preparation and antimicrobial activity of scleraldehyde from schizophyllum commune. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 2213–2219, 2010.

JIAO, G. et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, p. 196–223, 2011.

JIN, L. et al. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94, 14683–14688, 1997.

JOHNSON, D. J. Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation. **Journal of Biological Chemistry**, 281, 35478–35486, 2006.

JOL, C. N. et al. A novel high-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose. **Analytical Biochemistry**, v. 268, p. 213–222, 1999.

JOLIVET, E et al. Les extraits d'algues marines, propriétés phytoactives et intérêt agronomique. **Année Biologique**, v. 30, p. 109-126, 1991.

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

KALITNIK, A. A. et al. Low molecular weight derivatives of different carrageenan types and their antiviral activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 65–72, 2013.

KARA, S. et al. Cation effects on sol–gel and gel–sol phase transitions of κ -carrageenan–water system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 177–185, 2003.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**, v. 26, p. 259–315, 1988.

KNUTSEN, S. H. et al. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica Marina**, v. 37, p. 163-169, 1994.

KNUTSEN, S. H. et al. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica Marina**, v. 37, p. 163-169, 1994.

KNUTSEN, S. H.; GRASDALEN, H. The use of neocarrabiose oligosaccharides with different length and sulphate substitution as model compounds for ¹H-NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 229, p. 233-244, 1992.

KONKLE, B. A. et al. Heparin-induced thrombocytopenia: bovine versus porcine heparin in cardiopulmonary bypass surgery. **The Annals of thoracic surgery**, v. 7, 1920-1924, 2001.

KUTSCHMANN, E. M. Rheological analysis of the stability of pharmaceutical suspensions. **Manufacturing chemist**. v. 74, p. 50-51, 2003.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v.13 , p. 173–184, 2001.

LEIBBRANDT, A. et al. Iota-carrageenan is a potent inhibitor of influenza A virus infection. **PLoS ONE**, v. 5, e14320, 2010.

LI, D. F. et al. Biological properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin-PEG compositehydrogel fibers for wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 508–514, 2016.

LI, N. et al. Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p. 195–206, 2017.

LII, C. et al. Preliminary study on the degradation kinetics of agarose and carrageenans by ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 477–481, 1999.

LIPPACHER, A.; MULLER, R. H.; MADER, K. Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 561–567, 2004.

LUCA, L. et al. Trichloroisocyanuric/TEMPO oxidation of alcohols under mild conditions: a close investigation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 4999–5001, 2003.

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

MALKIN, Y. A. **Rheology Fundamentals**. Toronto: ChemTec, 1994.

MANGIONE, M. R. et al. K^+ and Na^+ effects on the gelation properties of κ -Carrageenan. **Biophysical Chemistry**, 113, p. 129–135, 2005.

MAO, R.; TANG, J.; SWANSON, B. G. Water holding capacity and microstructure of gellan gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 365–371, 2001.

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

MATULEWICZ, M. C. et al. Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 2937–2941, 1989.

McHUGH, D. J. Production and utilization of products from commercial seaweeds: FAO fisheries technical paper. In: STANLEY, N. **Production, properties and uses of carrageenan**. n. 288, 1987. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e05.htm> >. Acesso em: 03/08/2019.

McHUGH, D. J. Carrageenan. **A guide to the seaweed industry: FAO fisheries technical paper, n. 441**. Roma: Food and agriculture organization of the united nations, 2003. p. 68-71. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-y4765e.pdf> >. Acesso em: 18/08/2019.

MELO, F. R. et al. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: Different mechanisms for heparin and sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, 279, 20824–20835, 2004.

MENDONÇA, G. F.; MATTOS, M. C. S. Green chlorination of organic compounds using tichloroisocyanuric Acid (TCCA). **Current Organic Synthesis**, v.10, p. 820–836, 2013.

MICHEL, A-S.; MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 195-200, 1997.

MILAS, M.; RINAUDO, M. The gellan sol–gel transition. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, p. 177–184, 1996.

MOLLION, M. J.; MOREAU, S.; CHRISTIAN, D. Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoeulla verruculosa* (Bert) J. Agardh (Rhodophyta, Gigartinales). **Botanica Marina**, v. 29, p. 549–552, 1986.

MORRIS, E. R.; REES, D. A.; ROBINSON, G. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, p. 349–362, 1980.

MULLOY, B. et al. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. **Pharmacological Reviews**, 68, 76–141, 2016.

MULLOY, B.; FORSTER, M. J. Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. **Glycobiology**, v.10, p.1147–1156, 2000.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 2013, n. 4, p. 187–205, 2013.

NILSSON, S.; PICULELL, L.; JOÈNSSON, B. Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analyzed within the Poisson-Boltzmann cell model. 1. Effects of polyion concentration and counterion valency. **Macromolecules**, 22, p. 2367–2375. 1989.

NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; BEKKUM, H. VAN. Highly selective nitroxyl radicalmediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydrate Research**, v. 269, n. 1, p. 89–98, 1995.

OLSON, S. T. et al. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. **Biochimie**, v. 92, p. 1587–1596, 2010.

ONISHI, A. et al. Heparin and anticoagulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 21, p. 1372-1392, 2016.

PAINTER, T. J. **Algal Polysaccharides**. In: ASPINALL, G. The polysaccharides, v. 2, p. 195-285, 1983.

PAREDES-GAMERO, E. J. M. et al. Chemical Reduction of Carboxyl Groups in Heparin Abolishes its Vasodilatory Activity. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, p. 1359–1367, 2012.

PATIER, P. et al. Free or silica-bound oligokappa-carrageenans elicit laminarinase activity in *Rubus* cells and protoplasts. **Plant Science**, v. 9452, p. 27–35, 1995.

PEREZ, D.; MONTANARI, S.; VIGNON, M. R. TEMPO-mediated oxidation of cellulose III. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1417–1425, 2003.

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

PUJOL, C. A. et al. Antiviral activity of a carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against intraperitoneal murine herpes simplex virus infection. **Planta Medica**, v. 72, p. 121–125, 2006.

POMIN, V. H. Structure–function relationship of anticoagulant and antithrombotic welldefined sulfated polysaccharides from marine invertebrates. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 65, p. 195-209, 2012.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, p. 1016-1027, 2008.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. Structure versus anticoagulant and antithrombotic actions of marine sulfated polysaccharides. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 921-928, 2012.

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

POTIN, P. et al. Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. **Current Opinion in Microbiology**. v. 2, p. 276–283, 1999.

QUINDERÉ, A. L. et al. Is the antithrombotic effect of sulfated galactans independent of serpin? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, p. 43–53, 2014.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001.

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

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

RHEIN-KNUDSEN, N.; ALE, M. T.; MEYER, A. S. Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. **Marine Drugs**, v.13, p. 3340–3359, 2015.

ROBAL, M. et al. Monocationic salts of carrageenans: Preparation and physico-chemical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 656–667, 2017.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M. Mechanism of gel formation in kappa-carrageenan. **Biopolymers**, 23(4), 735–745, 1984.

ROMÁN, Y. et al. Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of fucogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 345-352, 2016.

RUDD, T.R.; YATES, E. A. Conformational degeneracy restricts the effective information content of heparan sulfate. **Molecular BioSystems**, v. 6, p. 902–908, 2010.

SANDERCOCK, P. M. L.; BARNETT, J. S. Characterization of the products formed by the reaction of trichlorocyanuric acid with 2-propanol. **Journal of Forensic Sciences**, v. 54, n. 6, p. 1336–1340, 2009.

SANKARANARAYANAN, N. V., et al. A hexasaccharide containing rare 2-O-sulfate-glucuronic acid residues selectively activates heparin cofactor II. **Angewandte Chemie International**, v. 56, p. 2312–2317, 2017.

SANTOS, G. C. **Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente TEMPO e o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante**. Curitiba: Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 124 p., 2015.

SANTOS-FIDENCIO, G. C. et al. Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, p. 286–293, 2019.

SCHINDEWOLF, M. et al. Heparin-induced skin lesions. **The Lancet**, v. 380, n. 9856, p. 1867-1879, 2012.

SHUKLA, P. S. et al. Carrageenans from red seaweeds as promoters of growth and elicitors of defense response in plants. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, p. 1-9, 2016.

SILVA, F. R. F. et al. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26–33, 2010.

SOARES, F. et al. Antifungal activity of carrageenan extracts from the red alga *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 2991-2998, 2016.

SONG, L. et al. The effect of cooking on the antibacterial activity of the dialdehyde starch suspensions. **Starch**, 62, 458–466, 2010.

STEVENSON, T.; FURNEAUX, R. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydrate Research**, 210, p. 277–298, 1991.

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

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

SUN, Y. et al. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of κ -carrageenan oligosaccharides obtained by degradation with κ -carrageenase from *Pedobacter hainanensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2398–2405, 2014.

SUN, Y. et al. Structural characterization and antioxidant activities of κ -carrageenan oligosaccharides degraded by different methods. **Food Chemistry**, v. 178, p. 311–318, 2015.

TALARICO, L. B. et al. Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. **The Journal of General Virology**, v. 92, n. 6, p. 1332–42, 2011.

THRIMAWITHANA, T R. et al. Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions. **Carbohydrate Polymers**, 82, p. 69–77, 2010.

TILSTAM, U.; WEINMANN, H. Trichloroisocyanuric acid: a safe and efficient oxidant. **Organic Process Research & Development**, v. 6, p. 384–393, 2002.

USOV, A. I. NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans. **Botanica Marina**, v. 27, p. 189-202, 1984.

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

USOV, A. I. Polysaccharides of the red algae. **Advances In Carbohydrate Chemistry And Biochemistry**, v. 6, p. 115-217, 2011.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M., Polysaccharides of Algae. 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae), using partial reductive hydrolysis. **Botanica Marina**, v. 34, p. 553-560, 1991.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M. Polysaccharides from Algae. 51. Partial reductive hydrolysis of sulfated galactan from red alga *Laurencia coronopus* J. Ag. (Rhodophyta, Rhodomelaceae). **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 23, p. 468-473, 1997.

USOV, A. I.; SHASHKOV, A. S. Polysaccharides of Algae. XXXIV: Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ¹³C-NMR spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 28, n. 9, 1985.

USOV, A. I.; YAROTSKY, S. V.; SHASHKOV, A. S. ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers**, v. 19, p. 977 -990, 1980.

VAN DE VELDE, F. et al. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VAN DE VELDE, F.; PEPPELMAN, H. A.; ROLLEMA, H. S.; HANS, R. On the structure of κ/ι -hybrid carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 331, p. 271–283, 2001.

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2309–2313, 2004.

VERA, J. et al. Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 79, p. 31–39, 2012.

VIANA, A. G. et al. Alkali modification of carrageenans. Part V. the iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 455–460, 2004.

WALENGA, J. M.; LYMAN, G. H. Evolution of heparin anticoagulants to ultra-lowmolecular-weight heparins: A review of pharmacologic and clinical differences and applications in patients with cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 1, p. 1-18, 2013.

WANG, F. F. et al. Antibacterial Activities of Kappa-Carrageenan Oligosaccharides. **Applied Mechanics and Materials**, v. 108, p. 194-199, 2012.

WANG, W. et al. Preparation and anti-influenza a virus activity of κ -carrageenan oligosaccharide and its sulphated derivatives. **Food Chemistry**, v. 133, p. 880–888, 2012.

WANG, Y. et al. Influence of cations on texture, compressive elastic modulus, sol-gel transition and freeze-thaw properties of kappa-carrageenan gel. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 530–535, 2018.

WENGERT, M.; SANSEVERINO, A. M; MATTOS, M. C. S. Trichloroisocyanuric acid: an alternate green route for the transformation of alkenes into epoxides. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 5, p.700-703, 2002.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 297-298, 1964.

WYATT, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chemica Acta**, v. 272, p. 1-40, 1993.

XU, Y. et al. Sulfated modification of the polysaccharides from blackcurrant and their antioxidant and α -amylase inhibitory activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1344-1354, 2018.

YAPHE, W.; ARSENAULT, G. P. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. **Analytical Chemistry**, 13, p. 143–148, 1965.

YATES, E. A.; RUDD, T. R. Recent innovations in the structural analysis of heparin. **International Journal of Cardiology**, v. 212, p. S5-S9, 2016.

YIN, R. et al. Oligosaccharides from depolymerized fucosylated glycosaminoglycan: Structures and minimum size for intrinsic factor Xase complex inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, p.14089–14099, 2018.

YU, G. et al. Structural studies on κ -carrageenan derived oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 433–440, 2002.

YUAN, H. et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 685–92, 2005.

ZHOU, G. et al. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 50, n. April 2002, p. 47–53, 2004.

ZHOU, G. et al. Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacological Research**, v. 53, p. 129–134, 2006.

ZHU, M. et al. Preparation, characterization and antibacterial activity of oxidized κ -carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1051–1058, 2017.

ANEXO 1

Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans

Reprodução do artigo intitulado “Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans” publicado em 15 de junho de 2019 no periódico Carbohydrate Polymers (volume 214, página 286-293; website: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.057>).

Gislaine C. dos Santos-Fidencio^a, Alan G. Gonçalves^b, Miguel D. Nosedá^a, Maria Eugênia R. Duarte^a, Diogo R. B. Ducatti^{a,}*

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, CEP 81-531-990, PO Box 19046, Curitiba, Brazil

^b Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Lothario Meissner, 3400, Jardim Botânico, Curitiba, Paraná, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1575

E-mail address: ducatti@ufpr.br (D.R.B. Ducatti)

Abstract

In this paper, carrageenans having distinct sulfation patterns (κ -, ι -, ι/ν -, θ - and λ -carrageenans), were fully or partially oxidized at C-6 of the β -D-Galp units using 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) and trichloroisocyanuric acid (TCCA) in bicarbonate buffer. The modified carrageenans were characterized by mono- and bidimensional ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The influence of the sulfate and carboxyl groups onto anticoagulant activity was evaluated using Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) *in vitro* assay. The results showed a synergic effect of the carboxyl groups on the anticoagulant activity, which was dependent on the regiochemistry of the sulfate groups in the polysaccharide backbone. Sulfate groups at C2 of the β -D-GalAp units appeared to positively influence the anticoagulant effect in comparison to C4-sulfate samples. Also, the partially oxidized κ -carrageenan derivative (κ LO) showed better anticoagulant effect than the fully oxidized carrageenan (κ HO).

Keywords

Carrageenans; Oxidation; TEMPO; Regiochemistry; Anticoagulant activity; Chemical modifications

Introduction

Heparin is the only polysaccharide worldwide used as a drug for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism. This glycosaminoglycan is obtained from animal tissues and presents a heterogeneous structure in terms of monosaccharide composition and sulfation pattern. The anticoagulant and antithrombotic effects of heparin are attributed to its interaction with proteases of coagulation cascade, such as thrombin and activated factor X (Xa), and their serpin inhibitors antithrombin and heparin cofactor II (Mulloy, Hogwood, Gray, Lever, & Page, 2016; Olson, Richard, Izaguirre, Schedin-Weiss, & Gettins, 2010). The protein-polysaccharide interaction is highly specific and depends on a pentasaccharide sequence found in heparin backbone (Jin et al., 1997; Johnson et al., 2006). Although heparin is the first choice to treat thromboembolism, some side effects such as bleedings and thrombocytopenia have been reported (Onishi, Ange1, Dordick, & Linhardt, 2016). Therefore, the discovery of new heparin mimetics is a promising research field (Al Nahain, Ignjatovic, Monagle, Tsanaktsidis, & Ferro, 2018).

To prepare heparin analogs obtained from polysaccharides, two main strategies have been used. The first approach promotes the chemical modification of polysaccharides obtained from different sources (de Carvalho et al., 2018; Li et al., 2017; Matsuhira, Barahona, Encinas, Mansilla, & Ortiz, 2014; Román, Iacomini, Sasaki, & Cipriani, 2016), while the second involves the study of natural sulfated polysaccharides obtained mainly from algae and marine invertebrates (Arata, Quintana, Raffo, & Ciancia, 2016; Alves, Almeida-Lima, Paiva, Leite & Rocha, 2016; Yin et al., 2018). Since chemically and naturally sulfated polysaccharides present structures different from heparin, the mechanism of action and consequently the

interaction with proteins in the coagulation cascade might be different (Glauser et al., 2009; Quinderé et al., 2014). Therefore, the identification of specific structures in the sulfated polysaccharide chain that could be correlated with the anticoagulant property is an important task to develop heparin analogs (Ciancia, Quintana, & Cerezo, 2010).

Carrageenans are sulfated galactans obtained from red algae, which have been used by the pharmaceutical and food industries as gelling and stabilizing agents. Those polymers are constituted by repeating disaccharide units of (1→3)-linked β -D-galactopyranose and (1→4)-linked α -D-galactopyranose, in which the α unit can be found as the 3,6-anhydro derivative. Also, sulfate groups are attached to specific hydroxyl groups creating diverse sulfation patterns in the polysaccharide backbone (Usov, 2011).

Previously, we studied the influence of sulfate regiochemistry on the anticoagulant activity of carrageenan derivatives synthesized by selective chemical sulfation (Araújo et al., 2013). Those results indicated that the substitution by sulfate at C6 of β -D-Galp and C2 of 3,6-anhydro- α -D-Galp units promoted a beneficial effect on the anticoagulant activity. Thus, in an effort to produce regioselective modifications in the carrageenan backbone to correlate the polysaccharide structure with the biological effect, we aimed the selective oxidation of five distinct carrageenans to evaluate the *in vitro* anticoagulant activity of the oxidized derivatives. We performed the TEMPO oxidation (Forget et al., 2013; Cosenza, Navarro, Pujol, Damonte, & Stortz, 2015; Santos, 2015) using trichloroisocyanuric acid (TCCA) as co-oxidant (Luca, Giacomelli, Masala, Porcheddu, & Chimica, 2003) to convert the β -D-Galp units into their uronic acid derivatives. Oxidized carrageenans containing different sulfation patterns were characterized using NMR, FT-IR and

colorimetric techniques, and then, submitted to aPTT assays to evaluate the effect of carboxyl groups and sulfation pattern in the anticoagulant activity.

Experimental

2.1 Materials

Kappa (κ N)-, *lambda*- (λ N) and a hybrid *iota/nu*-carrageenan (ι/ν N) were extracted from red algae *Kappaphycus alvarezzi*, *Gigartina skottsbergii* (tetrasporic phase) and *Eucheuma denticulatum*, respectively, as previously reported (Araújo et al., 2013). *Iota*- (ι N) and *theta*-carrageenan (θ N) were obtained after alkaline treatment of ι/ν N and λ N, respectively (see Supplementary data for details). Heparin sodium salt (UFH-192.0 IU/mg) was purchased from Merck (Germany). Trichloroisocyanuric acid (TCCA) and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All other chemicals and reagents used in the experiments were of analytical grade.

2.2 Optimization of the selective oxidation of κ N

The general method of oxidation was performed as follows: 50 mg of κ N and 4.4 mg of the catalyst TEMPO were dissolved in 7 mL of distilled water. Catalytic amounts of TCCA: 5.7, 14, 29, 57 or 86 mg were dissolved in 43 mL of 0.1 molL⁻¹ NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer, pH 9.6. Both solutions were cooled to 0 °C into an ice bath and added at once to each other. The reactions were stirred for 2 or 15 h. When the oxidations ended, they were quenched by addition of 4.3, 10.5, 22, 43 or 65 mL of ethanol and 50 mg of NaBH₄. The resulting solutions were neutralized with

concentrated acetic acid and dialyzed against distilled water. The oxidized polysaccharides were recovered after freeze-drying.

2.3 Selective oxidation of κ N, λ N, ι/ν N, ι N and θ N

Carrageenans (0.73 mmol) and 0.15 mmol of TEMPO were solubilized in 40 mL of distilled water and cooled to 0 °C in an ice bath. In parallel, TCCA (2.21 mmol) was dissolved in 260 mL of 0.1 molL⁻¹ NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer, pH 9.6, cooled to 0 °C and added to the polysaccharide solution. The reactions were stirred for 2 h. After that, ethanol (3 × the amount of TCCA) and 7.3 mmol of NaBH₄ were added and stirred for 1 h. The solutions were neutralized with concentrated acetic acid, dialyzed against distilled water and freeze-dried. Products obtained from κ N, λ N and θ N were named as κ HO, λ LO and θ LO, respectively. Samples ι/ν HO, ι HO, λ HO and θ HO were obtained as described previously, except that reactions were stirred for 15 h. For the preparation of κ LO, the reaction was performed with 0.73 mmol of TCCA (1 equiv.) and stirred for 2 h.

2.4 Quantification of the degree of oxidation (DOx) by ¹H NMR

The degree of oxidation (DOx) in the oxidized carrageenans was estimated using ¹H NMR. For κ -, ι/ν - and ι -carrageenans derivatives, DOx was calculated according to Equation 1:

$$\text{DOx} = 100 \% - \left[\frac{\frac{G_{5,6} \text{ Oxidized}}{G_2}}{\frac{G_{5,6} \text{ Native}}{G_2}} \times 100 \% \right] \quad (1)$$

$G_{5,6}$ and G_2 represent the integration areas corresponding to the H6/H5 and H2 of the β -D-Galp 4-sulfate units, respectively.

For λ - and θ -carrageenans derivatives, DOx was calculated according to Equation 2:

$$DOx = 100 \% - \left[\frac{\frac{G_{5,6} \text{ Oxidized}}{H_1}}{\frac{G_{5,6} \text{ Native}}{H_1}} \times 100 \% \right] \quad (2)$$

$G_{5,6}$ represents the integration area corresponding to the H6/H5 of the β -D-Galp 2-sulfate units and H_1 represents the integration area corresponding to the H1 of the α -D-Galp 2,6-disulfate or 3,6-anhydro- α -D-Galp 2-sulfate units.

2.5 Analytical methods

Total carbohydrate content was determined by the phenol-sulfuric acid method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956). The sulfate content was determined by the turbidimetric method of Dodgson & Price (1962) and the degree of sulfation (DS) was calculated according to Equation 3 (Whistler & Spencer, 1964), where Md is the molecular weight of a non-sulfated carrageenan diad and $S\%$ is the percentage of the sulfur.

$$DS = \frac{(Md \times S\%)}{3200 - (102 \times S\%)} \quad (3)$$

Uronic acids were determined by the method of Filisetti-Cozzi and Carpita (1991), using galacturonic acid as standard. 3,6-Anhydro-galactose was determined by the resorcinol method (Yaphe & Arsenault, 1965) using fructose as standard for the oxidized polysaccharides.

Monosaccharide composition was determined by the reductive hydrolysis procedure (Stevenson & Furneaux, 1991) using extra amount of the reducing agent borane 4-methylmorpholine complex (Jol, Neiss, Penninkhof, Rudolph, & De Ruiter, 1999; Falshaw & Furneaux, 1994), in order to avoid destruction of 3,6-anhydrogalactose. After acetylation, the resulting alditol acetates derivatives were

extracted with CHCl_3 , and samples were analyzed with a GLC-FID chromatograph (Trace GC Ultra, Thermo Electronic Corporation) equipped with a DB-225 capillary column ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$). The equipment was programmed to run at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min, then from 100 up to $230 \text{ }^\circ\text{C}$ at $60 \text{ }^\circ\text{Cmin}^{-1}$, using helium as carrier gas at a flow rate of 1 mLmin^{-1} .

Values of average molar mass (M_w) were determined on a Waters High-Performance Size-Exclusion Chromatography coupled with multi-angle static laser light scattering (DSP-F, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) and refractive index detector (Waters 2410, Milford, MA, USA) (HPSEC-MALLS-RI). The chromatographic separation was achieved with four Waters Ultrahydrogel columns (2000, 500, 250 and 120) connected in series with exclusion limits of 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , $5 \times 10^3 \text{ gmol}^{-1}$, respectively. Elution was carried out with $0.1 \text{ molL}^{-1} \text{ NaNO}_3$ solution containing NaN_3 (100 ppm/L), at a flow rate of 0.6 mLmin^{-1} at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The data were collected and analyzed by Wyatt Technology ASTRA software. A dextran standard curve (2000×10^3 , 487×10^3 , 266×10^3 , 78×10^3 , 40×10^3 and $9 \times 10^3 \text{ gmol}^{-1}$) was used to calculate the average molar mass (M_w).

The Fourier transform-infrared (FT-IR) spectra of oxidized and native polysaccharides were collected at the absorbance mode in the frequency range of $2400\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ using an Alpha spectrophotometer (Bruker, Germany). Spectra were obtained using OPUS Viewer (Bruker) software.

1D and 2D NMR spectra were acquired on a Bruker Avance DRX400 or Avance III NMR spectrometers operating at 400.13 or 600.13 MHz for ^1H , respectively, and equipped with a 5 mm wide-bore probe. Samples were deuterium exchanged by successive lyophilization steps in D_2O . The experiments were carried out using the pulse programs supplied with Bruker manual. According to the

samples, NMR analysis were recorded at temperatures between 50 to 70 °C. For the optimization of the selective oxidation, ^1H NMR spectra were acquired at 70 °C and the parameters were: pulse angle, 30°; acquisition time = 8.160 s; relaxation delay = 2.0 s; number of scans = 64 (Tojo & Prado, 2003). The chemical shifts were measured relative to internal acetone ($\delta = 2.208$ ppm for ^1H and $\delta = 32.69$ ppm for ^{13}C) (Van de Velde, Pereira & Rollema, 2004). The data were analyzed using the Bruker Topspin™ 3.5 software.

2.6 Anticoagulant activity assay

The activated partial thromboplastin time (aPTT) test was determined with a kit HemosIL® (Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA, USA), in KL-340 coagulation analyzer (Meizhou Cornley Hi-Tech Co., Ltda). Sheep plasma (100 μL) was incubated at 37 °C with 100 μL of saline, heparin, or polysaccharide samples. After 1 min aPTT reagent (100 μL) was added. After 2 min, 0.025 M CaCl_2 (100 μL) was added, and the clotting time was measured. For each group ($n = 3$), mean aPTT \pm standard error of the mean (SEM) was determined. The concentration required to triple the aPTT of saline (CaPTT_3) was fitted to a third-order polynomial equation using multiple regression analysis.

Results and Discussion

Oxidation of carrageenans

Kappa (κ N)-, *lambda*- (λ N) and a hybrid *iota/nu*-carrageenan (i/ν N) were obtained as previously reported by Araújo et al. (2013). *Iota* (i N)- and *theta* (θ N)-carrageenan were obtained from i/ν N and λ N samples, respectively, after chemical cyclization of α -D-Galp-2,6-disulfate units into their 3,6-anhydro derivatives in alkaline medium (Ciancia, Nosedá, Matulewicz, & Cerezo, 1993; Viana, Nosedá, Duarte, & Cerezo, 2004). Analysis of the monosaccharide composition of polysaccharide samples showed galactose and 3,6-anhydro-galactose as major monosaccharides (Table 1). These results were similar to previously reported studies describing the chemical structure of *kappa*-, *iota*, *iota/nu*- and *lambda*-carrageenan (Stevenson & Furneaux, 1991; Viana, Nosedá, Duarte, & Cerezo, 2004; Estevez, Ciancia & Cerezo, 2004). The amount of the major diads in the polysaccharide chain was calculated by integration of the α -anomeric hydrogens in the ^1H NMR spectra (Van de Velde, Knutsen, Usov, Rollema, & Cerezo, 2002). Together, this evaluation indicated that the obtained samples corresponded to the expected carrageenans, being considered appropriate for oxidation and evaluation of anticoagulant properties.

Table 1. Monosaccharide and diad composition, yield, sulfate content and average molar mass (M_w) of carrageenans extracted from three species of red seaweeds.

Carrageenan sample	Major diads (%) ^a	Yield (%) ^b	Monosaccharide Composition (mol %) ^c	DS ^d	M_w (g/mol) ^e
κN	G4S-DA ^f (88) G4S-DA2S (10) G4S-D6S (2)	40	6-Me-Gal (2.5)	1.0	360,000
			AnGal (45.4) Gal (51.2) Glc (0.7) Xyl (0.2)		
ι/νN	G4S-DA2S (66) G4S-D2S,6S (12) G4S-D6S (15) G4S-DA (7)	64	AnGal (33.7) Gal (60.0) Xyl (3.5) Man (0.5) Glc (2.3)	2.3	84,000
ιN	G4S-DA2S (84) G4S-D6S (9) G4S-DA (7)	30	AnGal (35.5) Gal (60.9) Xyl (2.0) Glc (1.6)	1.8	70,000
λN	G2S-D2S,6S (100)	53	AnGal (0.4) Gal (98.1) Glc (1.5)	3.0	578,000
θN	G2S-DA2S (100)	46	AnGal (47.6) Gal (51.8) Glc (0.6)	2.0	237,000

^a Diads were calculated by ¹H NMR analysis (Van de Velde, Knutsen, Usov, Rollema, & Cerezo, 2002). ^b Based on dry algae weight. ^c Monosaccharide composition was determined by GLC-FID analysis. 6-Me-Gal, AnGal, Gal, Xyl, Man and Glc correspond to 6-O-methylgalactose, 3,6-anhydrogalactose, galactose, xylose, mannose and glucose, respectively. ^d The degree of sulfation (DS) was determined by the turbidimetric method (Dodgson & Prince, 1962). ^e Average molar mass (M_w) were determined by HPSEC-MALLS-RI. ^f The letter code was based in the nomenclature described previously in the literature (Knutsen, Myslabodski, Larsen, & Usov, 1994). G, DA and D refer to the β-D-Galp, 3,6-anhydro-α-D-Galp and α-D-Galp units, respectively. The numbers refer to the carbon atom attached to the sulfate (S) group.

Oxidation at C6 of β-D-Galp units in carrageenans has been reported as an efficient method to convert galactose into its uronic acid derivative (Cosenza, Navarro, Pujol, Damonte, & Stortz, 2015; Forget et al., 2013). We have been studying this reaction in our labs (Santos, 2015) by employing kappa-carrageenan (κN) as substrate, TEMPO and TCCA (Luca, Giacomelli, Masala, Porcheddu, &

Chimica, 2003) in carbonate buffer pH = 9.6 (Figure 1 and Table 2). The degree of oxidation (DOx) in kappa-carrageenan backbone was estimated by observing the intensities of H5, H6_a, H6_b (overlapped) and H2 signals at 3.79 and 3.59 ppm, respectively, of β-D-Galp-4-sulfate units in the ¹H NMR spectra. The increase of TCCA amount independently of the reaction time promoted the decrease of H5/H6 signals intensities, indicating the selective oxidation of primary alcohol in the β-D-Galp-4-sulfate units (Figure 2). A reduction step with NaBH₄ was performed in the workup protocol. In these conditions the oxidation at C2 of 3,6-anhydro-α-D-Galp, as previously reported by Cosenza, Navarro, Pujol, Damonte, & Stortz (2015), was not observed.

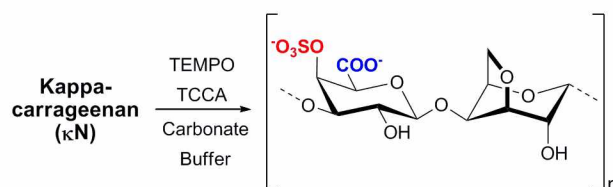


Figure 1. Selective oxidation of *kappa*-carrageenan (κN) using TEMPO and TCCA.

Table 2. Selected oxidation reactions using κ N as substrate.

Entry	TCCA (Equiv) ^a	Time (h)	DOx (%) ^b	DOxc (%) ^c	Yield (%) ^d
1	0.2	2	35	19	76
2	0.5	2	46	42	68
3	2.0	2	79	91	61
4	3.0	2	81	91	64
5	0.2	15	11	13	80
6	0.5	15	14	16	64
7	1.0	15	36	41	60
8	1.8	15	77	76	65
9	3.0	15	81	97	44

^a One equivalent of TCCA (232.41 g/mol) was the amount estimated to react with one hydroxyl group of kappa-carrageenan diad (408.04 g/mol). ^b The degree of oxidation (DOx) was calculated by ¹H NMR analysis. ^c The degree of oxidation (DOxc) was determined using GalA% obtained by the colorimetric method (Filisetti-Cozzi and Carpita, 1991). ^d Yields were calculated after dialysis and lyophilization.

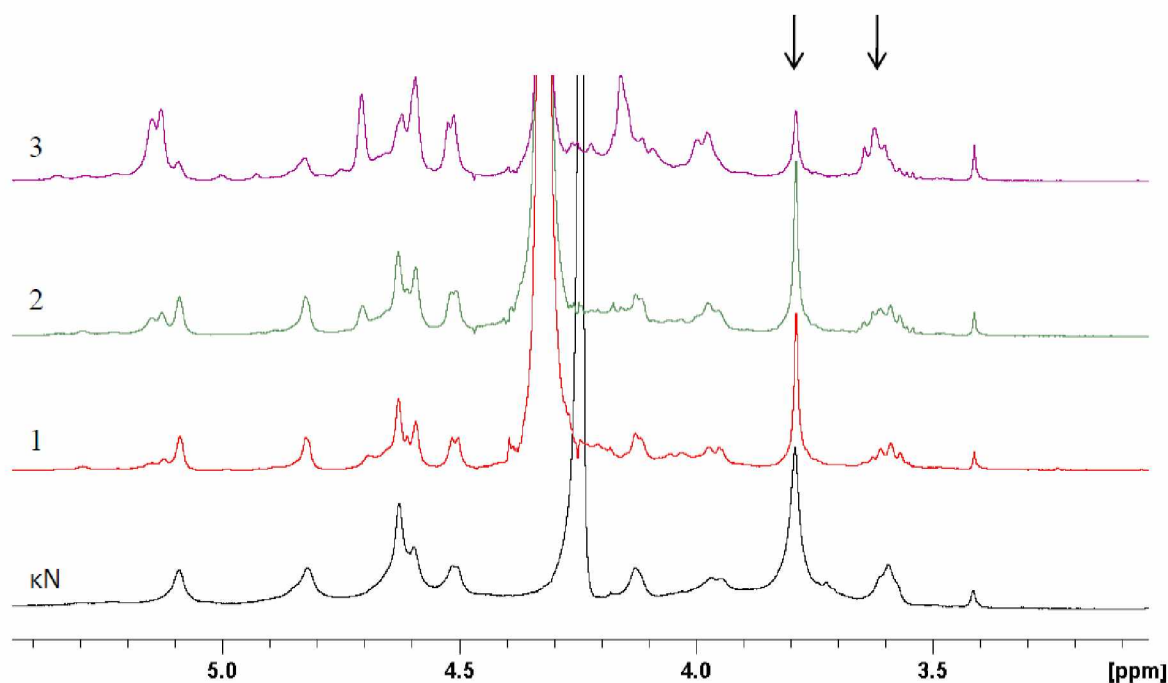


Figure 2. ¹H NMR spectra of the oxidation reactions using κ N. The number in the spectra refers to the entries of Table 2. Arrows indicate the signals used in the integration.

After this study, larger scale reactions with κ N, λ N and θ N were performed using the condition of entry 4 (3 equiv. of TCCA for 2 h) in Table 2 giving rise to κ HO, λ LO and θ LO, respectively (Table 3). In order to estimate the DOx, it was monitored the signal intensities of H5 and H6_a/H6_b of β -D-Galp units, which indicated a higher degree of oxidation for κ HO than λ LO and θ LO. In the sequence, ι N, ι /vN, λ N and θ N were submitted to the oxidation reaction by increasing the reaction time to 15 h rendering ι HO, ι /vHO, λ HO and θ HO, respectively (Table 3). ¹H NMR analysis of these oxidized carrageenans indicated a DOx higher than 95% and similar to κ HO sample. In order to obtain a kappa-carrageenan derivative with a lower degree of oxidation, a reaction utilizing 1 equiv. of TCCA was performed to give κ LO. The integration of H6_a/H6_b/H5 in the ¹H NMR spectrum of κ LO showed a DOx = 46%. The yields of all oxidized carrageenans recovered after ethanol precipitation and dialysis were between 46 and 83% (Table 3), even when some reactions were performed on a gram scale.

Table 3. DOx, molar mass (M_w) and chemical analysis of the oxidized carrageenan samples.

Sample	TCCA (Equiv)	Yield (%) ^a	Time (h)	DOx (%) ^b	GalA:AnGal:SO ₄ ^c	DS ^d	M_w (g/mol) ^e
κ LO	1	65	15	46	1.0 : 2.8 : 1.0	1.0	23,000
κ HO	3	83	2	> 95	1.0 : 1.5 : 0.6	0.9	12,000
ι HO	3	60	15	>95	1.0 : 1.6 : 1.3	1.5	33,000
ι /vHO	3	46	15	>95	1.0 : 1.6 : 1.0	1.0	17,000
λ LO	3	77	2	83	1.0 : 0.3 : 1.8	2.5	293,000
λ HO	3	75	15	>95	1.0 : 0.3 : 0.8	2.1	224,000
θ LO	3	74	2	80	1.0 : 1.7 : 0.9	1.7	162,000
θ HO	3	81	15	>95	1.0 : 1.2 : 0.8	1.4	92,000

^a Yields were calculated after dialysis and lyophilization. ^b The degree of oxidation (DOx) was calculated by ¹H NMR analysis. ^c GalA, AnGal and SO₄ correspond to galacturonic acid, 3,6-anhydrogalactose and sulfate, respectively. ^d The degree of sulfation (DS) was determined by the turbidimetric method (Dodgson & Prince, 1962). ^e Average molar mass (M_w) were determined by HPSEC-MALLS-RI analysis.

The oxidation of all carrageenan samples was also confirmed by a colorimetric assay to estimate the uronic acid content in the polysaccharide chain (Table 3). Furthermore, it was observed in FT-IR spectra new peaks around 1730 and 1400 cm^{-1} , which were attributed to $-\text{COOH}$ and $-\text{COO}^-$ stretches, respectively, (Su et al., 2013) in the sulfated $\beta\text{-D-GalA}_p$ units. The FT-IR spectra of κN , κLO and κHO are showed in Figure 3.

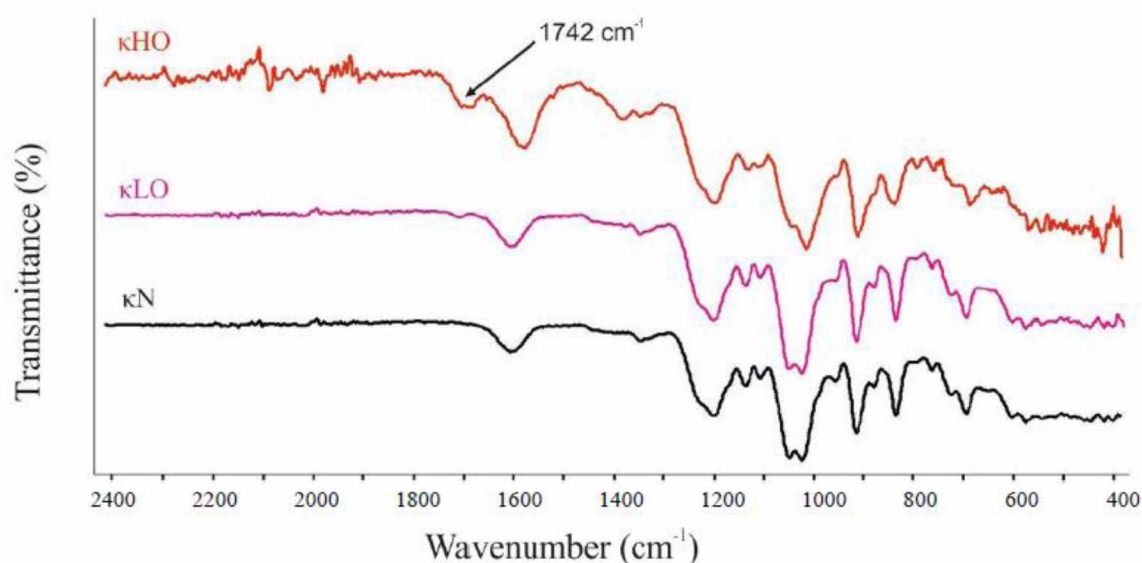


Figure 3. FT-IR spectra (2400 – 400 cm^{-1}) of κHO , κLO and κN samples. Arrow indicates the peak attributed to $-\text{COOH}$ group.

The complete ^1H and ^{13}C assignment of sulfated and oxidized carrageenan diads (Figure 4) were obtained through comparison of HSQC NMR spectra of modified polysaccharides with their corresponding native carrageenans (Araújo et al., 2013; Falshaw & Furneaux, 1994; Usov, 1984; Usov & Shashkov, 1985; Van de Velde, Pereira, & Rollema, 2004; Guibet, Kervarec, Génicot, Chevlot, & Helbert, 2006). An NMR characteristic observed in all correlation maps was the disappearance of the correlation around 63.0/3.81 ppm correspondent to G6/H6 of β -

D-Galp units and the appearance of new correlations attributed to C4/H4 and C5/H5 of β -D-GalAp units. The HSQC spectrum of θ HO sample is shown in Figure 5. The complete assignment of oxidized carrageenan diads are presented in Table 4.

Although the ^1H and HSQC NMR analysis did not show sulfate lost after TEMPO/TCCA oxidation, the turbidimetric sulfate quantification indicated an unexpected lower amount for some oxidized samples (Table 3). Differences in the stability of sulfate groups under acidic condition according to the position where they are linked in the carrageenan backbone have been reported (Gonçalves, Ducatti, Paranha, Duarte, & Nosedá, 2005). This effect associated with the presence of β -D-GalAp units might be the reason for the lower sulfate content detected by the turbidimetric method. It was also observed a reduction of the *M_w* for all carrageenan derivatives after the oxidation reactions (Table 1 and 3), which is a result frequently observed during TEMPO oxidation of polysaccharides under alkaline conditions (Cosenza, Navarro, Pujol, Damonte, & Stortz, 2015).

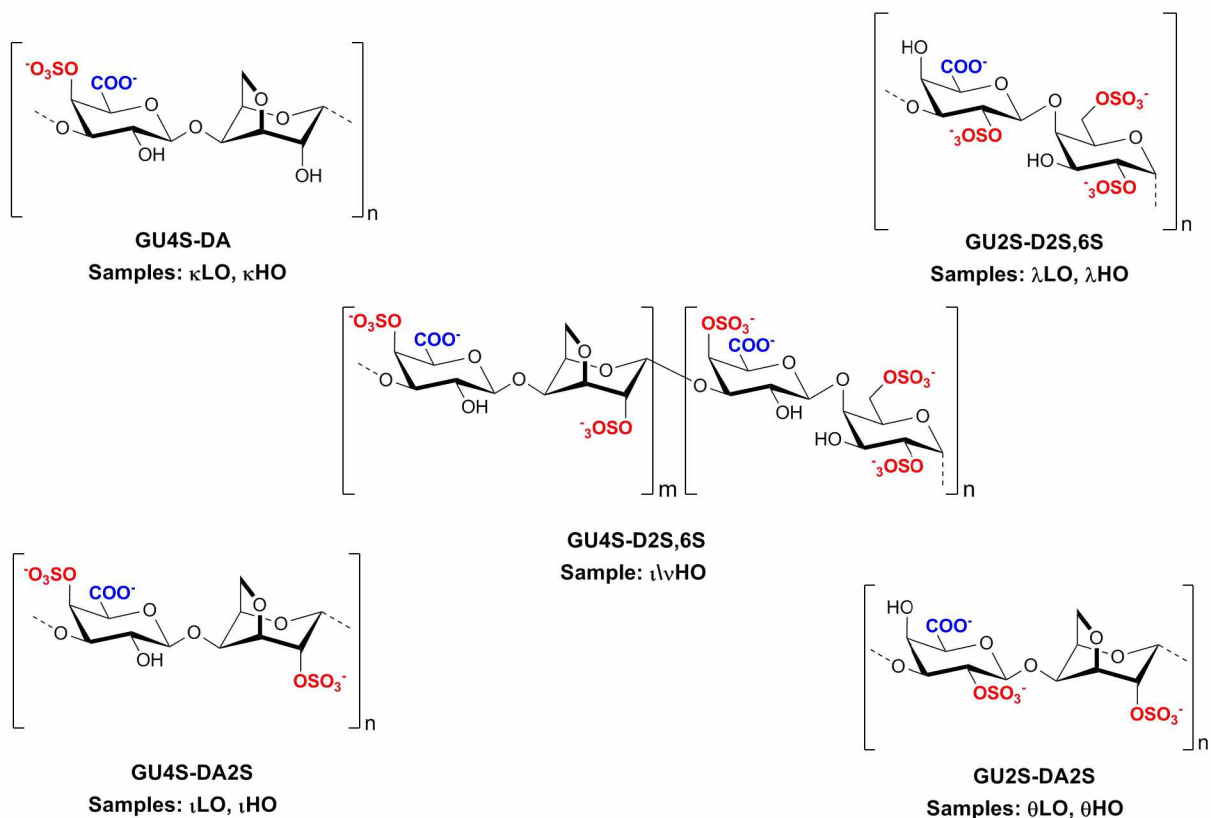


Figure 4. Structures of C-6 oxidized carrageenans. The structures represent the target diads synthesized and do not reflect the strict composition of the samples.

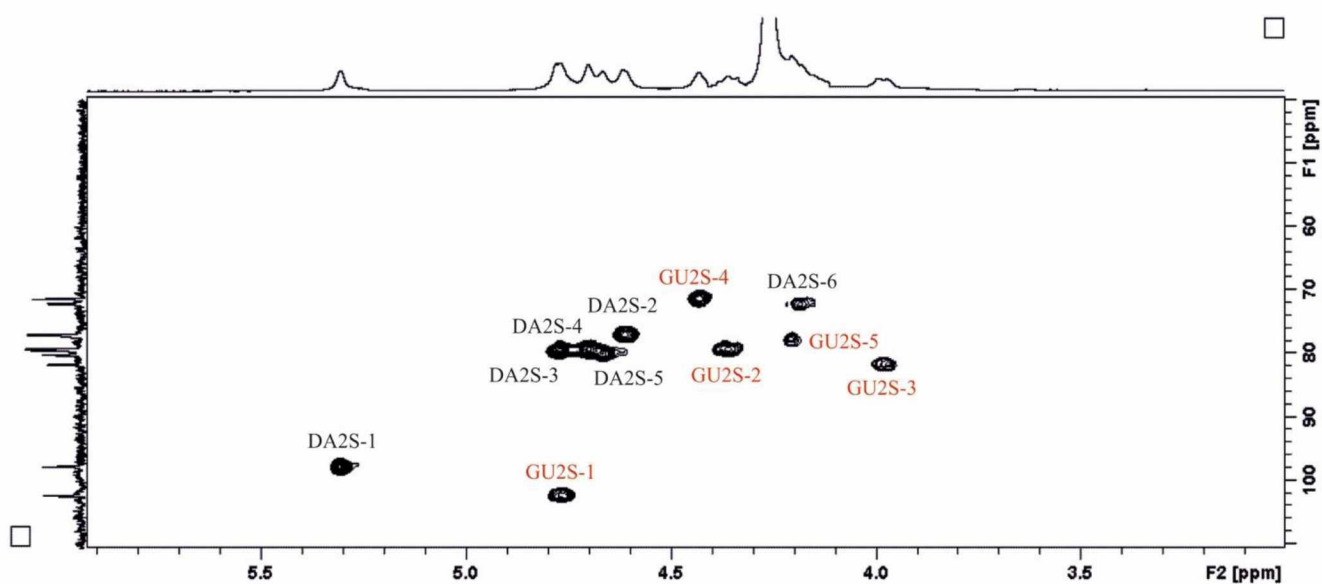


Figure 5. ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of θ HO sample. GU2S and DA2S refer to the β -D-GalAp 2-sulfate and 3,6-anhydro- α -D-Galp 2-sulfate units, respectively.

Table 4. ^1H and ^{13}C chemical shifts of oxidized carrageenans diads.

Sample	Unit		1 ^c	2	3	4	5	6	
								6a	6b
κHO	GU4S ^b	$^1\text{H}^{\text{a}}$	4.63	3.63	4.00	5.15	4.27	-	
		$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	104.2	71.2	80.9	77.4	76.1	174.4 ^d	
	DA	^1H	5.13	4.14	4.51	4.60	4.70	4.11	4.22
		^{13}C	97.2	71.9	81.2	80.4	78.7	71.5	
ιHO	GU4S	^1H	4.63	3.65	4.02	5.21	4.22	-	
		^{13}C	103.8	70.9	79.0	75.2	76.0	174.9	
	DA2S	^1H	5.34	4.66	4.83	4.68	4.74	4.30	4.14
		^{13}C	93.9	77.0	79.8	80.4	79.0	71.8	
λHO	GU2S	^1H	4.72	4.50	4.01	4.49	4.13	-	
		^{13}C	104.9	78.7	76.6	68.0	77.4	176.0	
	D2S,6S	^1H	5.57	4.69	4.22	4.28	4.55	4.37	4.37
		^{13}C	93.9	77.5	70.1	81.8	71.0	71.1	
θHO	GU2S	^1H	4.76	4.36	3.98	4.43	4.21	-	
		^{13}C	102.3	79.2	81.6	71.3	77.6	175.1	
	DA2S	^1H	5.31	4.61	4.77	4.70	4.67	4.19	
		^{13}C	97.8	76.8	79.3	79.2	80.1	72.2	

^a Chemical shifts (ppm) from HSQC and Edited-HSQC spectra. κHO and ιHO chemical shifts were similar to previously reported (Cosenza, Navarro, Pujol, Damonte, & Stortz, 2015). ^b The letter code was based in the nomenclature described previously in the literature (Knutsen, Myslabodski, Larsen, & Usov, 1994). GU, DA and D refer to the β-D-GalAp, 3,6-anhydro-α-D-Galp and α-D-Galp units, respectively. The numbers refer to the carbon atom attached to the sulfate (S) group. ^c Numbers refer to the carbons or hydrogens in the galactosyl and 3,6-anhydro galactosyl units. ^d Assignments obtained at pH 4 from the ^{13}C NMR spectrum.

Anticoagulant activity of oxidized carrageenans.

It has been reported that sulfated galactans obtained from red algae exert their anticoagulant effects via a serpin-dependent or -independent mechanism (Glauser et al., 2009; Melo, Pereira, Foguel, & Mourão, 2004; Quinderé et al., 2014). The serpin-dependent mechanism involves the inhibition of thrombin and factor Xa via antithrombin and heparin cofactor II, while the independent mechanism inhibits the intrinsic tenase and prothrombinase complexes. In order to obtain information about the importance of sulfate regiochemistry and galacturonic acid presence in the modified carrageenans (Figure 4), the anticoagulant property was evaluated by the

activated partial thromboplastin time (aPTT) test, which covers all reported mechanisms. All samples showed a dose-dependent increase of aPTT time (Table S1), therefore, in order to compare the activity of carrageenan samples, the concentration required to triple the saline time (CaPTT₃) was calculated (Figure 6).

The comparison of native samples indicated that λN was the most potent fraction, followed by ιN, θN, ι/νN and κN. These results were similar to previous works reporting *in vitro* anticoagulant activity of carrageenans containing the same sulfation pattern (Araújo et al, 2013; Sokolova et al., 2014). It is important to note that the ι/νN fraction, which presents di- and trisulfated diads, showed lower anticoagulant activity than carrageenans constituted by disulfated diads such as ιN and θN. Although the higher sulfated polysaccharide (λN) presented the best activity, these results suggested that the regiochemistry of sulfate groups in the polysaccharide chain is important. The ιN sample showed higher activity than θN, which suggested that sulfation at C4 of β-D-Galp units may be more relevant to the anticoagulant effect than sulfation at C2.

It has been reported that polymers containing galacturonic acid, such as pectins, do not present significant anticoagulant activity. However, chemical sulfation of those polysaccharides can increase the biological effect, suggesting that sulfate groups are more important than carboxyl for the anticoagulant activity (Bae et al., 2009; Fan et al., 2012; Maas et al., 2012). Nevertheless, it is difficult to evaluate whether sulfate and carboxyl groups have a synergic effect because this requires the comparison of sulfated polymers containing similar sulfation pattern in order to avoid misinterpretation due to the higher anticoagulant effect of sulfate groups. The native carrageenans and oxidized derivatives obtained in the present study showed similar sulfate content and in this way allowed us to evaluate such effect.

Comparison of oxidized carrageenans presenting higher degree of oxidation κ HO, λ HO and θ HO with their native samples indicated that the conversion of β -D-Galp units into its uronic acid derivative increased the anticoagulant activity. The exceptions were ι HO and ι /vHO, which showed lower activities than native samples ι N and ι /vN, respectively. Together, these data suggested that synergic effect of carboxyl groups in the anticoagulant activity of carrageenans is dependent of the regiochemistry of sulfate groups in the polysaccharide backbone. The biological properties of polysaccharides have been associated with the monosaccharide composition, anomericity and position of glycosidic bonds, degree and regiochemistry of sulfate groups and molar mass (Araújo et al., 2013; Cosenza, Navarro, Pujol, Damonte, & Stortz, 2015; de Carvalho et al., 2018; Jiao, Yu, Zhang, & Ewart, 2011; Pomin & Mourão, 2008; Xu et al., 2018). The main structural difference between oxidized carrageenans is the sulfation pattern. For instance, θ HO showed higher activity than ι HO and ι /vHO suggesting that sulfation at C2 of β -D-Galp units has a beneficial effect on anticoagulant property than substitution at C4. Recently, it has been reported that differences in the sulfation pattern of synthetic oligosaccharides containing C2-sulfate uronic acid are important to specifically bind heparin cofactor II but not antithrombin (Sankaranarayanan et al., 2017).

It is worth noting that κ LO ($DO_x = 46\%$) showed better activity than fully oxidized κ HO ($DO_x > 95\%$), which indicated that complete oxidation of β -D-Galp units was not the attribute for providing a more intense biological effect. Therefore, the increase in charge density promoted by carboxyl groups is not the principal feature to explain the higher anticoagulant activity of oxidized kappa-carrageenan derivatives. Forget et al. (2013) reported that TEMPO-mediated oxidation of agarose and kappa-carrageenan changed secondary structures of those polysaccharides shifting from

helices to β -sheets. Therefore, conformational alterations induced by partial oxidation of β -D-Galp units in κ LO may be one of the reasons to explain the better anticoagulant effect.

The selective C6-oxidation of β -D-Galp units was efficient to improve the anticoagulant effect of some carrageenans. However, for κ LO and κ HO the CaPTT₃ was still high compared with heparin (CaPTT₃ = 6.4 μ g mL⁻¹, Table S2). The most potent anticoagulant effect was observed to λ N, λ LO, λ HO, θ LO and θ HO samples, which showed activity in a concentration range similar to heparin. It is important to note that the oxidation of *theta*-carrageenan (θ N) increased seven times the CaPTT₃ of θ LO and θ HO samples. Together, these results suggested that oxidized derivatives of *lambda*- and *theta*-carrageenan are good candidates for further investigation of their potential as anticoagulants.

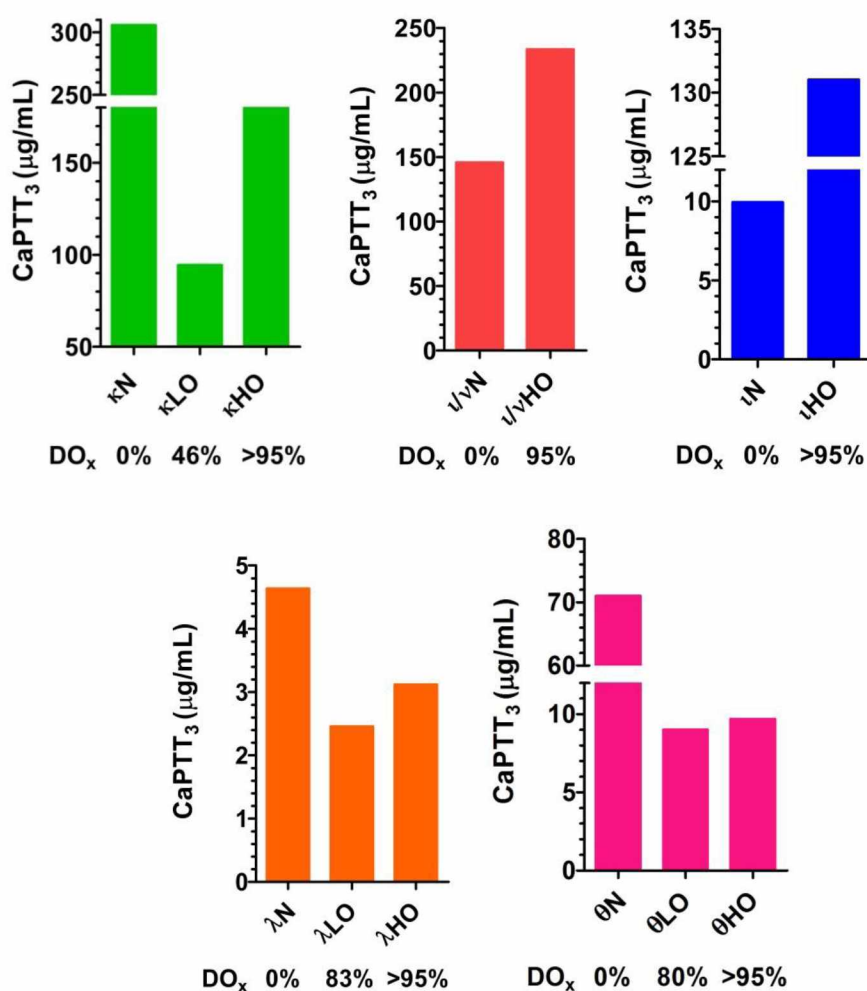


Figure 6. Dependence on the degree of oxidation (DO_x) and sample concentration required to triple aPTT of saline (CaPTT₃).

Conclusions

In conclusion, we have reported the production of carrageenan derivatives containing β -D-GalAp units and different sulfation patterns. *Theta*- and *lambda*-carrageenan were oxidized and characterized for the first time. The anticoagulant activity assays indicated that the introduction of the uronic acid in the carrageenan backbone increased the anticoagulant activity. However, a synergic effect of carboxyl groups is dependent on the regiochemistry of sulfate groups in the oxidized polysaccharides. The presence of sulfate groups at C2 of β -D-GalAp units showed a

better anticoagulant effect than at C4. Also, partial instead of full oxidation of kappa-carrageenan showed better anticoagulant effect. Although these results encourage the synthesis of new carrageenan derivatives for the identification of structural requirements to increase anticoagulant properties, additional *in vitro* and *in vivo* assays are still needed.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação Araucária (294-2014), CNPq (476111/2013-7 and 483722/2012-0) and PRONEX-Carboidratos (14669/1809). Also, this study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. G. C. S. was the beneficiary of scholarships from CNPq Foundation, Brazil (nº133363/2013-9 and 141933/2015-1). D. R. B. D., M.D.N. and M.R.D. are Research Members of the National Research Council of Brazil (CNPq). The authors are grateful to NMR Center of Federal University of Paraná for the NMR analysis and CTEFAR (Universidade Federal de Santa Maria-RS) for supplying of sheep plasma.

References

- Al Nahain, A., Ignjatovic, V., Monagle, P., Tsanaktsidis, J., & Ferro, V. (2018). Heparin mimetics with anticoagulant activity. *Medicinal Research Reviews*, *38*, 1582-1613.
- Alves, M. G. C. F., Almeida-Lima, J., Paiva, A. A. O., Leite, E. L., & Rocha, H. A. O. (2016). Extraction process optimization of sulfated galactan-rich fractions from *Hypnea musciformis* in order to obtain antioxidant, anticoagulant, or immunomodulatory polysaccharides. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 1931-1942.

Arata, P. X., Quintana, I., Raffo, M. P., & Ciancia, M. (2016). Novel sulfated xylogalactoarabinans from green seaweed *Cladophora falklandica*: chemical structure and action on the fibrin network. *Carbohydrate Polymers*, *154*, 139–150.

Araújo, C. A., Nosedá, M. D., Cipriani, T. R., Gonçalves, A. G., Duarte, M. E. R., & Ducatti, D. R. B. (2013). Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. *Carbohydrate Polymers*, *91*, 483–491.

Bae, I. Y., Joe, Y. N., Rha, H. J., Lee, S., Yoo, S. H., & Lee, H. G. (2009). Effect of sulfation on the physicochemical and biological properties of citrus pectins. *Food Hydrocolloids*, *23*, 1980-1983.

Ciancia, M., Nosedá, M. D., Matulewicz, M. C., & Cerezo, A. S. (1993). Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. *Carbohydrate Polymers*, *20*, 95–98.

Ciancia, M., Quintana, I., & Cerezo, A. S. (2010) Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. *Current Medicinal Chemistry*, *17*, 2503–2529.

Cosenza, V. A., Navarro, D. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., & Stortz, C. A. (2015). Partial and total C-6 oxidation of gelling carrageenans. Modulation of the antiviral activity with the anionic character. *Carbohydrate Polymers*, *128*, 199–206.

de Carvalho, M. M., de Freitas, R. A., Ducatti, D. R. B.; Ferreira, L. G., Gonçalves, A. G., Colodi, F. G., Mazepa, E., Aranha, E. M., Nosedá, M. D., & Duarte, M. E. R. (2018). Modification of ulvans via periodate-chlorite oxidation: Chemical characterization and anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*, *197*, 631-640.

Dodgson, K. S., & Prince, R. G. (1962). A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharide. *Biochemical Journal*, *84*, 106-110.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350-356.

Estevez, J. M., Ciancia, M., & Cerezo, A. S. (2004). The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. *Carbohydrate Research*, *339*, 2575-2592.

Falshaw, R., & Furneaux, R. (1994). Carrageenan from the tetra-spore stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, *252*, 171-182.

Fan, L. H., Gao, S., Wang, L., Wu, P., Cao, M., Zheng, H., Xie, W., & Zhou, J. (2012). Synthesis and anticoagulant activity of pectin sulfates. *Journal of Applied Polymer Science*, *124*, 2171-2178.

Filisetti-Cozzi, T. M., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, *197*, 157-162.

Forget, A., Christensen, J., Lüdeke, S., Kohler, E., Tobias, S., Matloubi, M., Thomann, R., & Shastri, V. P. (2013). Polysaccharide hydrogels with tunable stiffness and provasculogenic properties via α -helix to β -sheet switch in secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*, 12887-12892.

Glauser, B., Rezende, R. M., Melo, F. R., Pereira, M. S., Francischetti, I. M. B., Monteiro, R. Q., Rezaie, A. R., & Mourão, P. A. S. (2009). Anticoagulant activity of a sulfated galactan:

serpin-independent effect and specific interaction with factor Xa. *Thrombosis and Haemostasis*, 102, 1183-1193.

Gonçalves, A. G., Ducatti, D. R. B., Paranha, R. G., Duarte, M. E. R., & Nosedá, M. D. (2005). Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. *Carbohydrate Research*, 340, 2123–2134.

Guibet, M., Kervarec, N., Génicot, S., Chevolut, Y., & Helbert, W. (2006). Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* λ -carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 341, 1859-1869.

Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. S. (2011). Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Marine Drugs*, 9, 196–223.

Jin, L., Abrahams, J.P., Skinner, R., Petitou, M., Pike, R.N., & Carrell, R.W. (1997). The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14683–14688.

Johnson, D. J., Langdown, J., Li, W., Luis, S.A., Baglin, T.P., & Huntington, J.A. (2006). Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 35478–35486.

Jol, C. N., Neiss, T. G., Penninkhof, B., Rudolph, B., & De Ruiter, G. A. (1999). A novel high-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose. *Analytical Biochemistry*, 268, 213-222.

Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B., & Usov, A. I. (1994). A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina*, *37*, 163-169, 1994.

Li, N., Liu, X., He, X., Wang, S., Cao, S., Xia, Z. Xian, H., Qin, L., & Mao, W. (2017). Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. *Carbohydrate Polymers*, *159*, 195-206.

Luca, L., Giacomelli, G., Masala, S., Porcheddu, A., & Chimica, D. (2003). Trichloroisocyanuric / TEMPO oxidation of alcohols under mild conditions: a close investigation. *Journal of Organic Chemistry*, *68*, 4999–5001.

Maas, N. C., Gracher, A. H. P., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Iacomini, M., & Cipriani, T. R. (2012). Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. *Carbohydrate Polymers*, *89*, 1081-1087.

Matsuhiro, B., Barahona, T., Encinas, M. V., Mansilla, A. & Ortiz, J. A. (2014). Sulfation of agarose from subantarctic *Ahnfeltia plicata* (Ahnfeltiales, Rhodophyta): studies of its antioxidant and anticoagulant properties in vitro and its copolymerization with acrylamide. *Journal of Applied Phycology*, *26*, 2011–2019.

Melo, F. R., Pereira, M. S., Foguel, D., & Mourão, P. A. S. (2004). Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 20824-20835.

Mulloy, B., Hogwood, J., Gray, E., Lever, R., & Page, C. P. (2016) Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacological Reviews*, *68*, 76–141.

Olson, S. T., Richard, B., Izaguirre, G., Schedin-Weiss, S., & Gettins, P. G. (2010). Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie*, *92*, 1587–1596.

Onishi, A., Ange1, K. St., Dordick, J. S., & Linhardt, R., J. (2016). Heparin and anticoagulation. *Frontiers in Bioscience*, *21*, 1372-1392.

Pomin, V. H., & Mourão, P. A. (2008). Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*, *18*, 1016-1027.

Quinderé, A. L. G., Santos, G. R. C., Oliveira, S. N. M. C. G., Glauser, B. F., Fontes, B. P., Queiroz, I. N. L., Benevides, N. M. B., Pomin, V. H., & Mourão, P. A. S. (2014). Is the antithrombotic effect of sulfated galactans independent of serpin?. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *12*, 43–53.

Román, Y., Iacomini, M., Sasaki, G. L., & Cipriani, T. R. (2016). Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of *Agaricus bisporus* fucogalactan. *Carbohydrate Polymers*, *146*, 345-352.

Sankaranarayanan, N. V., Strebel, T. R., Boothello, R. S., Sheerin, K., Ranghuraman, A., Sallas, R., Mosier, P. D., Watermeyer, N. D., Oscarson, S., & Desai, U. R. (2017). A hexasaccharide containing rare 2-O-sulfate-glucuronic acid residues selectively activates heparin cofactor II. *Angewandte Chemie International Edition*, *56*, 2312-2317.

Santos, G. C. (2015). Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente TEMPO e o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante. 124 p, Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Sokolova, E. V., Byankina, A. O., Kalitnik, A. A., Kim, Y. H., Bogdanovich, L. N., Solov'eva, T. F. & Yermak, I. M. (2014). Influence of red algal sulfated polysaccharides on blood coagulation and platelets activation in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *102*, 1431-1438.

Stevenson, T., & Furneaux, R. (1991). Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research*, *210*, 277-298.

Su, Y., Chu, B., Gao, Y., Wu, C., Zhang, L., Chen, P., Wang, X., & Tang, S. (2013). Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness. *Carbohydrate Polymers*, *92*, 2245-2251.

Tojo, E., & Prado, J. (2003). A simple ^1H NMR method for the quantification of carrageenans in blends. *Carbohydrate Polymers*, *53*, 325-329.

Usov, A. I. (2011). Polysaccharides of the red algae. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *65*, 115-217.

Usov, A. I. (1984). NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans. *Botanica Marina*, *27*, 189-202.

Usov, A. I., & Shashkov, A. S. (1985). Polysaccharides of Algae. XXXIV: Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ^{13}C -NMR spectroscopy. *Botanica Marina*, *28*, 367-374.

Van de Velde, F., Knutsen, S.H., Usov, A. I, Rollema, H. S., & Cerezo, A. S. (2002). ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, *13*, 73-92.

Van de Velde, F., Pereira, L., & Rollema, H. S. (2004). The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydrate Research*, 339, 2309–2313.

Viana, A. G., Nosedá, M. D., Duarte, M. E. R., & Cerezo, A. S. (2004) Alkali modification of carrageenans. Part V. the iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, 58, 455–460.

Whistler, R. L., & Spencer, W. W. (1964). Sulfation. *Methods Carbohydrate Chemistry*, 4, 297-298.

Xu, Y., Gao, Y., Liu, F., Niu, X., Wang, L., Li, X., Chen, H., & Yang, Y. (2018). Sulfated modification of the polysaccharides from blackcurrant and their antioxidant and α -amylase inhibitory activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1344-1354.

Yaphe, W., & Arsenault, G. P. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides (1965). *Analytical Chemistry*, 13, 143-148.

Yin, R., Zhou, L., Gao, N., Li, Z., Zhao, L., Shang, F., Wu, M., & Zhao, J. (2018).

Oligosaccharides from depolymerized fucosylated glycosaminoglycan: Structures and minimum size for intrinsic factor Xase complex inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 14089-14099.

ANEXO 2

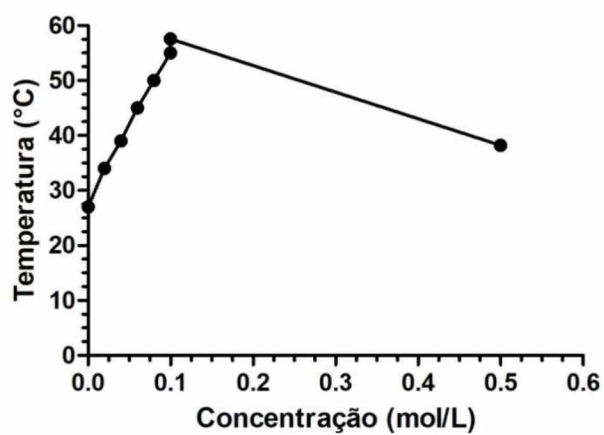
Amostra	Cátion	Concentração (mol/L)	Tg (°C)
--	K+	0	27
--	K+	0,02	34
--	K+	0,04	39
--	K+	0,06	45
--	K+	0,08	50
--	K+	0,1	55
K	K+	0	--
K-0,1K	K+	0,1	57,6
K-0,5K	K+	0,5	38,2

FONTE: O autor (2019).

Valores obtidos para os dados de 0h.

Dados obtidos em Wang et al. (2018)

TEMPERATURA DE GELIFICAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE KCl.



FONTE: Dados obtidos de Wang et al. (2018) e O autor (2019).