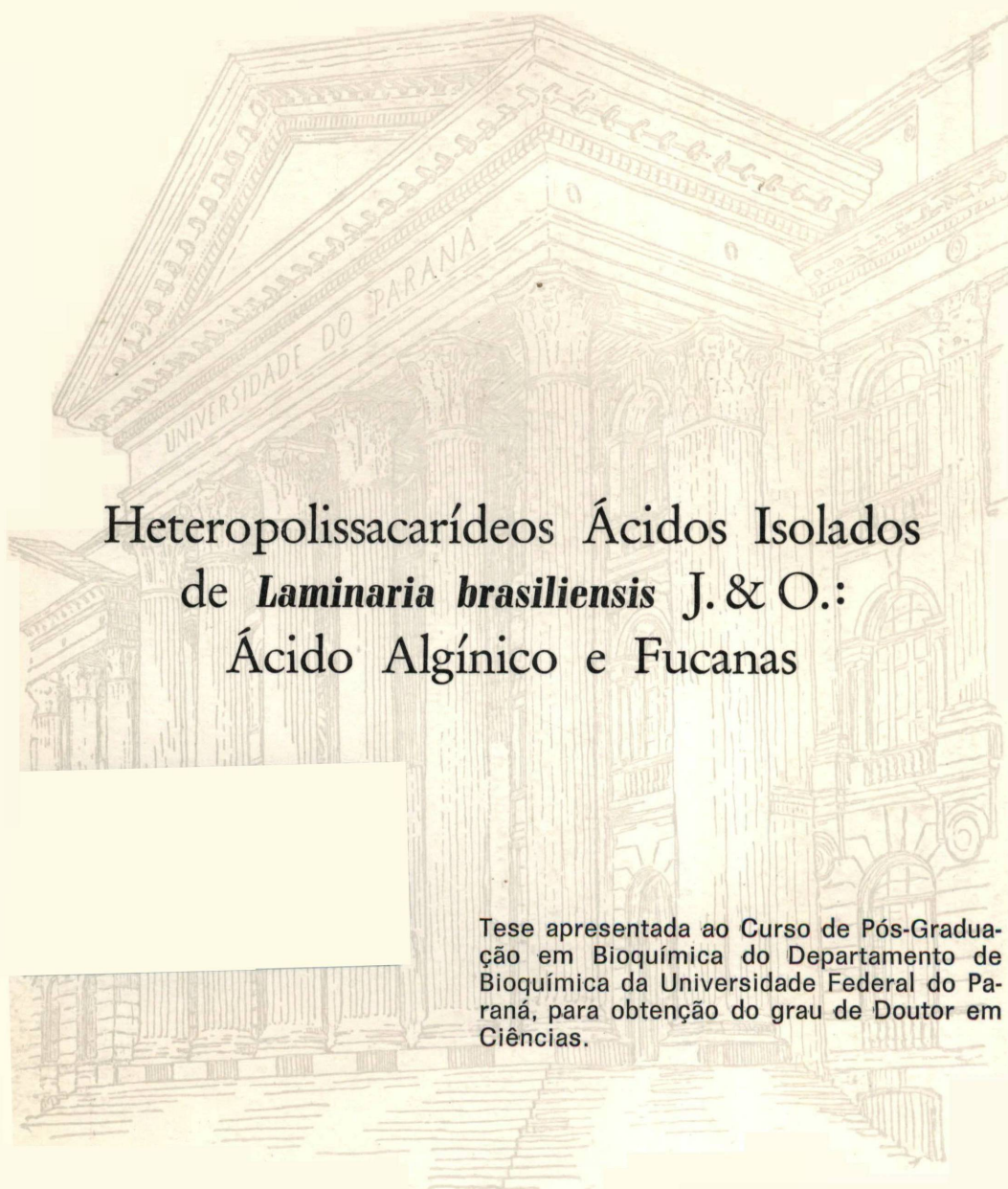


MARIA EUGÊNIA RABELLO DUARTE



Heteropolissacarídeos Ácidos Isolados
de *Laminaria brasiliensis* J. & O.:
Ácido Algínico e Fucanas

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

CURITIBA
1990

MARIA EUGÊNIA RABELLO DUARTE

Heteropolissacarídeos Ácidos Isolados
de *Laminaria brasiliensis* J. & O.:
Ácido Algínico e Fucanas

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

CURITIBA

1990

Orientadores: Prof. Dr. José H. Duarte

Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

Para Michael e Carolina,
com carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. José Hazencleve Duarte e Dr. Albert James Gorin pela orientação necessária a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. José Domingos Fontana, Chefe do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pelo apoio e estímulo a realização deste trabalho e pela mediação junto ao CNPq para a realização do estágio no exterior (Universidade de Buenos Aires).

Ao professor Dr. Alberto S. Cerezo pela valiosa orientação no estudo das heterofucanas sulfatadas. Aos prof. Dra. M. Cristina Matulewicz e Dr. Carlos A. Stortz e demais integrantes do grupo de pesquisa do Dr. Cerezo. A profa. Dra. Nelida Mazzini, professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica da Universidade de Buenos Aires pela amizade, sugestões e assistência técnica.

Ao Dr. Mytosk Mazurek (Plant Biotechnology Institute, Nacional Research Council, Saskatchewan, Canadá) e ao professor Dr. Marcello Iacomini (Pós-Doutoramento na Itália) que realizaram as análises de r.m.n.-¹³C do alginato.

Aos Professores Dr. João Batista Chaves Correa, Dra. Fany Reicher e Pe. Guido Edgar Wenzel pela assistência nas análises de c.f.g.

A Professora Gissélia Rabello Duarte e ao Doutorando Michael Daniel Nosedá pelo apoio e pelas valiosas contribuições nas discussões dos mecanismos de reação de açúcares sulfatados.

Ao professor Dr. Antonio Salvio Mangrich e Professora Stela Romanowisk pelos estudos de coordenação de ácido algínico de L. brasiliensis com íons.

A todos Professores, Funcionários, Colegas de Pós-Graduação e de Iniciação Científica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pela contribuição na realização deste trabalho.

A Angela Lacombe Feijó pela confecção dos desenhos apresentados neste trabalho.

A Gillian Pellegrino Barbosa pelo processamento deste texto.

A toda Equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pela grande assistência prestada.

Ao CNPq pela concessão de Bolsa no Exterior (Universidade de Buenos Aires - 1989) e pelo auxílio-projeto Ácido Algínico de L. brasiliensis e a FINEP (Projeto Apoio ao Grupo de Química de Carboidratos).

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xii
Lista de Esquemas	xv
Lista de Abreviaturas	xvi
I - INTRODUÇÃO.	01
1. GENERALIDADES	01
2. FUCANAS : CONSIDERAÇÕES GERAIS.	04
3. HETEROFUCANAS	05
3.1. ASCOFILANA	05
3.2. SARGASSANAS	07
3.3. PELVECIANAS	09
3.4. FUCANAS CONTENDO ÁCIDOS URÔNICOS.	11
3.4.1 Padinanas	11
4. ALGUNS ASPECTOS DA QUÍMICA DOS AÇÚCARES SULFATADOS.	14
4.1. INFRA-VERMELHO (I.V.)	14
4.2. OXIDAÇÃO COM PERIODATO.	16
4.3. HIDRÓLISE ÁCIDA DE ESTER SULFATO EM CARBOIDRATO	18
4.4. DESSULFATAÇÃO DOS ÉSTERES SULFATO POR ALCALI.	19
4.5. OUTROS MÉTODOS DE DESSULFATAÇÃO DE GRUPOS SULFATO.. . . .	22
4.6. DESSULFATAÇÃO ENZIMÁTICA.	23
5. ALGUNS ASPECTOS ESTRUTURAIS DE FUCANAS.	24

ÁCIDO ALGÍNICO	32
1. GENERALIDADES	32
2. ESTRUTURA DO ÁCIDO ALGÍNICO	35
3. BIOSÍNTESE DE ÁCIDO ALGÍNICO.	38
4. HIDRÓLISE PARCIAL DE ÁCIDO ALGÍNICO	41
II MATERIAL E MÉTODOS	45
1. METODOLOGIA GERAL	45
1.1. TITULOMETRIA.	46
1.2. ANÁLISE DE INFRAVERMELHO (I.V.)	46
1.3. MÉTODOS CROMATOGRAFICOS E ELETROFORÉTICOS	47
1.4. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (c.f.g.)	48
1.5. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (c.f.g. - e.m.)	49
1.6. RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (r.m.n. $-^{13}\text{C}$)	50
1.7. METILAÇÃO	50
2. POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS DE <u>L. brasiliensis</u> :	
ÁCIDO ALGÍNICO E FUCANA	50
2.1. Local de Coleta:	50
2.2. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE <u>L. BRASILIENSIS</u>	51
2.2.1. Despigmentação e delipidificação.	51
2.2.2. EXTRAÇÃO DE MANITOL	51

2.2.3. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS EM ÁGUA.	52
2.2.4. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u> POR TRATAMENTO COM ALCALI.	52
2.3 - PURIFICAÇÃO DA FUCANA BRUTA (F.B.) de <u>L. brasiliensis</u>	53
2.3.1. DESPROTEINIZAÇÃO DA FUCANA F.B.	53
2.3.2. PURIFICAÇÃO DA FUCANA COM CLORETO DE CÁLCIO E CETAVLON	54
2.3.3. PURIFICAÇÃO DA FUCANA F.P. POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	55
2.4. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DA FUCANA F-075	55
2.5. CARBOXI-REDUÇÃO DA FRAÇÃO F-075	56
2.6. CONSUMO DE META-PERIODATO DE SÓDIO E ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO DA FUCANA F-075.	57
2.6.1. OXIDAÇÃO.	57
2.6.2. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE NaIO_4	57
2.6.3. PRODUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO	58
2.6.4. DEGRADAÇÃO DE SMITH DA FRAÇÃO F-075	59
2.7. CROMATOGRAFIA EM BIO-GEL DA FUCANA F-075.	59
2.8. DESSULFATAÇÃO DA FUCANA F-075	60
2.8.1. TRATAMENTO ALCALINO ($\text{NaOH}/\text{NaBH}_4$).	60
2.8.1.1. TRATAMENTO COM METÓXIDO DE SÓDIO.	61
2.8.2. TRATAMENTO COM METANOL-HCl DA FUCANA F-075.	61
2.8.3. TRATAMENTO SOLVOLÍTICOS	62
2.8.3.1. PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO	62
2.8.3.2. TRATAMENTO COM D.M.S.O.	63

2.9. DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DA	
FUCOSE NA FUCANA F-075.	63
2.10. CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO GLUCURÔNICO NA	
FUCANA F-075	64
2.11. METILAÇÃO DA FUCANA	65
2.11.1. HIDRÓLISE DA FUCANA METILADA	66
2.12. HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA.	67
2.12.1. CARBOXI REDUÇÃO DA FRAÇÃO FD	68
2.12.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FD-2XEDC E FD-2,	
EM COLUNA DE BIO-GEL	69
2.12.3. METILAÇÃO DA FRAÇÃO FD-1-EDC E FD-A-2xEDC	69
2.12.4. DEGRADAÇÃO DE SMITH DA FRAÇÃO FD-A-2xEDC	70
2.12.5. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FA EM COLUNA DE CELULOSE	70
2.12.6. METILAÇÃO E OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO	
DA FRAÇÃO FA-I	71
2.13. CARBOXI-REDUÇÃO DO ÁCIDO ALGÍNICO DE	
<u>L. brasiliensis</u>	72
2.13.1. DETERMINAÇÃO DO EQUIVALENTE-GRAMA DO ÁCIDO	
ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u>	74
2.13.2. HIDRÓLISE DO ÁCIDO ALGÍNICO.	75
2.13.3. METILAÇÃO DA FRAÇÃO A-EDC.	76
2.13.4. SEPARAÇÃO DO ÁCIDO MANURÔNICO E	
GULURÔNICO POR COMPLEXAÇÃO COM BRUCINA	76
2.13.5. HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO ÁCIDO ALGÍNICO	
DE <u>L. brasiliensis</u>	78

2.13.6. REDUÇÃO DOS GRUPOS CARBOXÍLICOS DAS FRAÇÕES FS E FI, OBTIDAS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO ÁCIDO ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u> . . .	79
2.13.7. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO F-H, EM COLUNA DE CELULOSE	80
2.13.8. TRATAMENTO ÁCIDO DA L-GULOSE	81
III - RESULTADOS E DISCUSSÕES	83
APÊNDICE I - FORMAÇÃO DO ANEL EPÓXIDO, POR TRATAMENTO ALCALINO, DE CARBOIDRATO ^{22,97}	172
APÊNDICE II - LESSONANAS	177
BIBLIOGRAFIA	180
SUMMARY	199
PUBLICAÇÕES	201

LISTAS DE TABELAS

I -	COMPONENTES CONSTITUINTES DOS POLISSACARÍDEOS DAS DIVISÕES PHAEOPHYTA, RHODOPHYTA E CHLOROPHYTA.	02
II -	RELAÇÃO M/G DE ÁCIDO ALGÍNICO OBTIDO DE PHAEOPHYTAS E BACTÉRIAS	37
III -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FUCANAS DE <u>L. brasiliensis</u> FRACIONADAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.. . . .	93
IV -	ANÁLISE (c.f.g.) ^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DAS FUCANAS FRACIONADAS EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE (Cl ⁻). . .	94
V -	ANÁLISE POR c.f.g. ^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA FUCANA F-075 E DA FUCANA F-075 CARBOXI-REDUZIDA.. . . .	100
VI -	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DAS FUCANAS F-075 E F-075-EDC, (c.f.g.) ^a	102
VII -	ANÁLISE POR c.f.g. ^a DE OCTIL GLICOSÍDEOS.	106
VIII -	ROTAÇÃO ÓTICA DE FUCANAS E DE SEUS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL.. . . .	108
IX -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA (F.P.) ^a	114
X -	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA FRAÇÃO DEGRADADA FD-1, POR c.f.g. ^a	121
XI -	ANÁLISE POR c.f.g. ^a DE OCTIL-GLICOSÍDEOS DA FRAÇÃO FD-1 . . .	125
XII -	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA FRAÇÃO DEGRADADA FD-2, POR c.f.g. ^a	127

XIII -	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR MÉDIO DAS FRAÇÕES FD ^a	129
XIV -	ANÁLISE POR c.f.g. ^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FUCANA F-075 OXIDADA COM META-PERIODATO DE SÓDIO	134
XV -	ANÁLISE COMPARATIVA DA FUCANA (F-075) E DA FRAÇÃO DEGRADADA (FD-2×EDC) APÓS OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO DE SÓDIO.	137
XVI -	ANÁLISE POR c.f.g. ^a DO ALGINATO CARBOXI-REDUZIDO POR TRATAMENTO COM DERIVADO DE CARBODIIMIDA E NaBH ₄	144
XVII -	ANÁLISE POR c.f.g. ^a DO ALGINATO CARBOXI-REDUZIDO POR TRATAMENTO COM ÓXIDO DE PROPILENO / NaBH ₄ ^b	146
XVIII -	CARBOXI-REDUÇÃO ^a DO ÁCIDO ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u>	147
XIX -	HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO ALGINATO DE <u>L. brasiliensis</u>	159
XX -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PESO MOLECULAR MÉDIO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL ^a , CARBOXI- REDUZIDOS DO ALGINATO DE <u>L. brasiliensis</u>	160
XXI -	ROTAÇÃO ÓTICA DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL ^a DO ÁCIDO ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u>	161
XXII -	ROTAÇÃO ÓTICA DO ALGINATO ANTES E APÓS CARBOXI- REDUÇÃO ^a COM ÓXIDO DE PROPILENO/NaBH ₄	162
XXIII -	DESVIOS QUÍMICOS DE r.m.n.- ¹³ C DO POLÍMERO DE <u>L. brasiliensis</u>	179
XXIV-	ANÁLISE (c.f.g.) ^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO ÁCIDO ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u>	167
XXV -	DESVIOS QUÍMICOS DE r.m.n.- ¹³ C DO POLÍMERO DEGRADADO DE <u>L. nigrescens</u>	163

LISTAS DE FIGURAS

1 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO DE FUCANA F.P. EM DEAE-CELULOSE (Cl ⁻), ELUIÇÃO POR ETAPAS.	96
2 - ANÁLISE POR c.f.g. ^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FUCANA F-075 ^b	97
3 - ANÁLISE POR c.f.g. ^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE , (GLICOSÍDEOS), DAS FUCANAS F-075 E F-075-EDC.	101
4 - CROMATOGRAMAS DA FUCANA F-075 EM COLUNAS DE GÉIS	104
5 - ANÁLISE POR c.f.g. ^a DE (-)-2-OCTIL GLICOSÍDEOS, OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE DA FUCANA F-075.	107
6 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO ÓTIMO DE HIDRÓLISE ^a DA FUCANA F-075.	110
7 - ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO	115
8 - ANÁLISE POR c.p. DESCENDENTE DA FRAÇÃO FA, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P.	116
9 - ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM (1700 V ~15 mA) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P..	117
10 - ANÁLISE POR c.f.g. ^a DA FRAÇÃO FD-1, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P.	122
11 - CROMATOGRAMA DA FUCANA FD-2xEDC, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P..	124
12 - CROMATOGRAMA DA FUCANA FD-2, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F-075	128
13 - CURVA DE OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO DE SÓDIO DA FUCANA F-075	132

14 - ANÁLISE ^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FUCANA F-075 OXIDADA COM META-PERIODATO DE SÓDIO	133
15 - ANÁLISE POR c.p. ASCENDENTE DA FRAÇÃO FD-1, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P..	138
16 - CURVA DE HIDRÓLISE ^a DO ÁCIDO ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u> COM ÁCIDO TRIFLUORACÉTICO.	141
17 - ANÁLISE POR c.f.g. ^a DO ÁCIDO ALGÍNICO APÓS CARBOXI-REDUÇÃO, POR TRATAMENTO COM DERIVADO DE CARBODIIMIDA / NaBH ₄ ^b	143
18 - ANÁLISE POR c.f.g. ^a DO ÁCIDO ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u> , CARBOXI-REDUZIDO, POR TRATAMENTO COM ÓXIDO DE PROPILENO/NaBH ₄ ^b	145
19 - EQUILÍBRIO ÁCIDO DA GULOSE	148
20-A - CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE (T.F.A. 1 N A 100° POR 8 h) - ALDITOL ACETATO	150
20-B - ESPECTRO DE MASSA DO DERIVADO 1,6-anidro-gulose	151
20-C - ESPECTRO DE MASSA DO DERIVADO 1,6-anidro-talose deuterada	152
21 - ALGUNS DOS FRAGMENTOS ^a DO 1,6-anidro- β -L-gulose, OBTIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE MASSA ^b	153
22 - ESPECTROS DE r.m.n.- ¹³ C DO ÁCIDO ALGÍNICO DE <u>L. brasiliensis</u> , OBTIDO A 360 MHz EN RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ¹ H, NA TEMPERATURA DE 33°, EM D ₂ O	155
23 - ESPECTROS DE r.m.n.- ¹³ C DO ÁCIDO ALGÍNICO CARBOXI-REDUZIDO, DE <u>L. brasiliensis</u> , OBTIDO A 360 MHz EN RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ¹ H, NA TEMPERATURA DE 33°, EM D ₂ O..	156
24 - ESPECTROS DE r.m.n.- ¹³ C DOS BLOCOS DE ÁCIDO α -L-GULURÔNICO DE <u>L. brasiliensis</u> , OBTIDO A 300 MHz EN RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ¹ H, NA TEMPERATURA DE 25°, EM D ₂ O	164

25 - ESPECTROS DE r.m.n.- ¹³ C DOS BLOCOS DE ACIDO β -D-MANURÔNICO DE <u>L. brasiliensis</u> , OBTIDO A 300 MHz EN RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ¹ H, NA TEMPERATURA DE 25°, EM D ₂ O	166
26 - ANÁLISE POR c.f.g. ^a DA FRAÇÃO FS-CMC ^b	168
27 - ANÁLISE POR c.f.g. ^a DA FRAÇÃO FI-CMC ^b	169

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA A - EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE <u>L. brasiliensis</u>	85
ESQUEMA B - PURIFICAÇÃO DA FUCANA FB DE <u>L. brasiliensis</u>	90
ESQUEMA C - HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA DE <u>L. brasiliensis</u>	113
ESQUEMA D - CARBOXI-REDUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FD OBTIDA APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA DE <u>L. brasiliensis</u>	123
ESQUEMA E - HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO ALGINATO DE <u>L. brasiliensis</u>	158

LISTA DE ABREVIATURAS

- c.f.g. - Cromatografia em fase gasosa.
- c.f.g.em - Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectroscopia de massa.
- CMC - 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate
- c.p. - Cromatografia em papel.
- EDC - 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide.
- g.p. - Grau de polimerização.
- MES - (2-[N-morpholinoethanesulfonic acid)
- r.m.n.¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono-13.
- TES - (N-tris[hydroxymethyl] methyl-2-aminoethane sulfonic acid)
- FB - Fucana bruta, extração com água a 99°.
- FP - Fucana purificada por cetavlon.
- F-H20 - Fração obtida por fracionamento da fucana FP em coluna de DEAE-celulose, eluição com água.
- F-025 - Idem, eluição com KCl 0,25M.
- F-050 - Idem, eluição com KCl 0,50M.
- F-075 - Idem, eluição com KCl 0,75M.
- F-100 - Idem, eluição com KCl 1,00M.
- F-075-EDC - Fucana carboxi-reduzida.

- FD-1 - Fração degradada obtida de FP.
- FD-2xEDC - FD-1 carboxi-reduzida, (2 vezes).
- FD-1-EDC - Sub-frações de FD=2xEDC obtidas após fracionamento e FD-II-EDC em Bio-Gel P-30.
- FD-2 - Fração degradada obtida de F-075.
- FD-A - Sub frações de FD-2, obtidas após fracionamento em e FD-B Bio-Gel P-30.
- FD-A-2xEDC - FD-A carboxi-reduzida, (2 vezes).
- FA - Fração ácida obtida após hidrólise ácida parcial da fucana FP.
- FA-1 - Fração FA, purificada em coluna de celulose.
- A-EDC - Ácido algínico carboxi-reduzido com derivado de carbodiimida/NaBH₄.
- A-1-OP; - Ácido algínico submetido ao primeiro, segundo e A-2-OP; terceiro tratamento de carboxi-redução com óxido A-3-OP. de propileno/NaBH₄, respectivamente.
- FH - Fração hidrolisável obtida por hidrólise ácida parcial do ácido algínico.
- FI - Fração insolúvel em pH 2,85, correspondendo a "blocos" de ácido α -L-gulurônico, obtidos por hidrólise parcial do ácido algínico.
- FS - Fração solúvel em pH 2,85, correspondendo a "blocos" de ácido β -D-manurônico, obtidos por hidrólise parcial do ácido algínico.
- FI-CMC - Fração solúvel e fração insolúvel carboxi-reduzidas e FS-CMC com derivado de carbodiimida/NaBH₄.
- FI-OP - Fração solúvel e fração insolúvel carboxi-reduzidas e FS-OP por tratamento com óxido de propileno/NaBH₄.

RESUMO

Da alga parda Laminaria brasiliensis foram extraídos dois tipos de polissacarídeos ácidos: heterofucanas sulfatadas e ácido algínico. Manitol foi obtido como único carboidrato de baixo peso molecular.

O alginato de L. brasiliensis, (22,4%), copolímero binário e linear é formado de unidades de ácido β -D-manurônico, (M) e α -L-gulurônico, (G) substituídos em O-4. A relação molar M/G de 1,16:1, obtida por espectroscopia de r.m.n.- ^{13}C foi confirmada por processos alternativos como metilação e cromatografia em fase gasosa.

O isolamento, por hidrólise parcial do alginato, de blocos virtualmente homogêneos de ácidos manurônico e gulurônico indica que para o polímero uma estrutura em bloco.

O alginato contém blocos M (g.p.19-26) e G (g.p.16-20) e regiões híbridas contendo unidades M e G distribuídas ao longo da molécula.

A L. brasiliensis também sintetiza vários polissacarídeos sulfatados constituídos principalmente de fucose e adicional quantidade de glucose, xilose e ácido urônico. Os polímeros fracionados em coluna de DEAE-celulose eram formados dos mesmos monossacarídeos, mas em proporções variáveis, indicando que os polissacarídeos originais constituem uma família de polissacarídeos correlacionados, denominados de heterofucanas.

As unidades de α - \underline{L} -fucose, (63%) neste heteropolímero estão substituídas principalmente em O-2 com grupo sulfato em C-4. O posicionamento do grupo sulfato foi confirmado pelo isolamento de fucose 4-sulfato nos produtos de hidrólise parcial e por espectroscopia de I.V. (absorção em 845 cm^{-1}).

A estabilidade do grupo sulfato à ação de alcali e típico arranjo cis-vicinal desde que num arranjo *trans*, tal grupo podia ser facilmente eliminado.

Uma fração contendo manose, (73%) e ácido urônico foi obtida após remoção da fucose, (por tratamento com ácido) de uma das frações de heterofucanas. Hidrólise desta fração carboxi-reduzida forneceu manose (78%) e glucose (8%) indicando que o componente ácido é ácido glucurônico. Esta fração foi submetida à degradação de Smith e a formação de eritritol (23,5%) e glicerol (26,3%) é compatível com substituição glicosídica em O-4 e O-6.

Outra fração rica em galactose foi examinada utilizando o reagente de quiral (-)-2-octanol e a c.f.g. do derivado acetato do octil glicosídeo demonstrou que a galactose tem a forma \underline{L} . Este isômero não foi observado em heterofucanas de alga parda.

Em comum com as heterofucanas previamente investigadas a sequência de tais componentes foram apenas parcialmente elucidadas.

I - INTRODUÇÃO

1. GENERALIDADES

As algas marinhas constituem a maior fonte de polissacarídeos, de origem natural cuja quantidade excede àquela sintetizada pelas plantas terrestres e algas ducículas.

Embora a classificação das algas seja baseada na sua morfologia, principalmente do sistema reprodutivo e na natureza dos pigmentos, o conhecimento da química de seus polissacarídeos poderá constituir um método auxiliar em estudos taxonômicos. Combinando-se esses processos de investigação, é possível uma melhor caracterização de divisões ou de gêneros da várias algas.

Todas espécies de algas contêm clorofila "a", mas as Rhodophytas, contém em adição, um pigmento vermelho, biliproteína, (ficoeritrina), enquanto a cor marron das Phaeophytas é devida à uma combinação de dois pigmentos, fucoxantina e xantofila.

Entre os vários monossacarídeos que são comuns aos polissacarídeos de plantas, alguns são confinados a polissacarídeos de certas divisões de alga (tabela I)

TABELA I - COMPONENTES CONSTITUINTES DOS POLISSACARÍDEOS DAS DIVISÕES PHAEOPHYTA, RHODOPHYTA E CHLOROPHYTA.

Componente	Phaeophyta	Rhodophyta	Chlorophyta
L-galactose		+	
D-frutose			+
L-arabinose			+
ácido D-galacturônico		+	
ácido D-manurônico	+		
ácido L-gulurônico	+		
L-fucose	+		+
L-raminose			+
manitol	+		
sulfato	+	+	+

De acordo com os dados da tabela I, verifica-se que a galactana, [D e L -gal μ , (ester-sulfato), 3,6-anidro $-D-$ ou L -Gal μ e 6- D -metil-Gal μ], é característica de alga vermelha (Rhodophyta). Ácido algínico (β - D -man ρ A e α - L -gul μ A), bem como fucana, (heteropolissacarídeo sulfatado, contendo fucose), tem sido observados em alga parda (Phaeophyta). Os polissacarídeos formados de glucose, exceto celulose (comum em algas), ocorrem em certas divisões de algas: laminarana em Phaeophyta; amido, em Chlorophyta. Os polissacarídeos de algas azuis (Cyanophytas) e de diatomáceas (Bacillariophytas), já foram investigados do ponto de vista estrutural, mas em número reduzido e insuficiente para serem correlacionados com a taxonomia das algas.

Vários fatores influenciam a composição química ou acarretam variações na estrutura dos polissacarídeos de alga. Para muitas espécies de alga, tais variações são dependentes da: a) estação do ano (sazonal); b) meio ambiente (habitat); c) profundidade de imersão; d) fase de desenvolvimento celular; e) da espécie (inter-específica).

Nos países de clima frio, os polissacarídeos apresentam alterações quantitativas e estruturais. É conhecido que a quantidade de laminarana e de manitol aumenta nos meses de abril a setembro, enquanto a proporção de ácido algínico e celulose diminui neste período. Por outro lado, verifica-se um aumento crescente destes últimos polissacarídeos no decorrer dos meses de outubro a abril. Nos países de clima frio a variação sazonal condiciona a coleta do ácido algínico o que provavelmente não deve ocorrer no Brasil.

Muitas dessas variações tem sido constatadas em algas pardas (Phaeophyta), e devem ser portanto consideradas nas investigações estruturais dos polissacarídeos isolados de tais algas. Os principais polissacarídeos isolados de algas pardas são: ácido algínico, fucanas e laminarana.

Em virtude da variação inter-específica dos alginatos e da complexidade estrutural das fucanas, serão incluídos na presente revisão alguns aspectos estruturais destes polímeros em diferentes gêneros de alga parda.

2. FUCANAS : CONSIDERAÇÕES GERAIS.

KYLIN⁵³, isolou de algas pardas, (Laminaria digitata, Fucus vesiculosus, Ascophyllum nodosum) polissacarídeos cujo principal produto de hidrólise foi identificado como um derivado de fucose, (fenil- α -fucosazona). Denominações como fucoidana e fucana foram adotadas.

Posteriormente PERCIVAL & ROSS⁹⁵, extraíram da alga parda Himanthalia lorea, L. hyperborea, F. vesiculosus e de F. spiralis, um polissacarídeo, (fucoidan), contendo alto teor de sulfato, (38%), e de fucose, (56,7%), além de galactose, (4%), xilose, (1,5%), ácido urônico, (3%) e metais, (8%).

A maioria dos polissacarídeos posteriormente investigados e considerados como fucanas, apresentam composição química heterogênea, podendo mesmo serem consideradas como heteropolissacarídeos.

No presente trabalho o nome fucana será utilizado, por tradição, para polissacarídeos sulfatados predominantemente formados de unidades de α -fucose, mas contendo quantidades variáveis de outros açúcares.

PERCIVAL⁹⁶, não considera desejável generalizar o nome fucoidana ou fucana para todos os polissacarídeos ricos em fucose.

KLOAREG *et al.*⁵², consideram como estrutura ideal das fucanas aquelas que apresentem uma cadeia principal formada de unidades de α - α -fucose e substituídas em C-2 (ligação

glicosídica); C-3 (cadeia lateral de fucose de tamanho variável) e C-4 (sulfato semi-éster). A maioria das fucanas investigadas afastam-se do modelo ideal. Fucana (fucoidana), é portanto um termo genérico utilizado para designar uma família de polímeros correlacionados, não homogêneos, cuja composição química varia com as espécies.

KLOAREG *et al.*⁵², classificam esta família de polissacarídeos em dois grupos: A) homofucanas polímeros que se aproximam da estrutura ideal das fucanas. Estas moléculas não contêm ácidos urônicos ou proteína e existem em poucas espécies. B) heterofucanas do tipo xilo-galacto-urono-fucana. Estas últimas, são moléculas com menor teor de fucose e sulfato do que aquelas do grupo "A". Pode-se incluir neste grupo: a) Ascofilana, b) Sargassana, c) Pelveciana d) Fucana contendo ácido urônico.

Em virtude da complexidade estrutural das fucanas, muitas vezes é difícil enquadrá-las na divisão proposta por KLOAREG *et al.* Entretanto será adotado, tanto quanto possível tal classificação.

3. HETEROFUCANAS

3.1. ASCOFILANA

Os polissacarídeos sulfatados isolados de alga parda são complexos e de difícil caracterização. MEDECALF e LARSEN^{71,72} reinvestigaram os polissacarídeos ácidos precipitados por cetavlon, de Ascophyllum nodosum e de Fucus vesiculosus, por

precipitação fracionada com etanol, (em presença de cloreto de magnésio ou de cálcio). Os autores obtiveram várias frações de polissacarídeos com apreciável grau de pureza quando testados por eletroforese, em pH 2 e 7.

Do A. nodosum foram obtidas cinco frações, contendo os mesmos constituintes do polímero original, mas em proporções variáveis (sulfato, ácido urônico, fucose, xilose, manose, galactose, glucose e proteína). O mesmo ocorre com as três frações obtidas de F. vesiculosus.

Como nenhuma fucana sulfatada pura, (fucana sulfatada ideal), foi isolada, é razoável considerar os polímeros isolados de tais algas como heteropolissacarídeos de uma família, que apresentam os mesmos constituintes, mas em proporções variáveis. Tal família tem sido comumente denominada de ascofilana ou tipo ascofilana.^{54,57,58}

Posteriormente, MEDCALF e LARSEN⁷² submeteram as frações 1, 2, e 3, isoladas anteriormente da alga parda A. nodosum, à degradação ácida suave, (HCl, 0,02M por 1h à 80°). A fração "2" parcialmente degradada forneceu, por precipitação fracionada com etanol, dois componentes diferenciados pelos teores de ácido urônico (24,1%) e fucose (42%), respectivamente.

Estes dados demonstram que o complexo ascofilana é formado de segmentos enriquecidos de ácidos urônicos ou de fucose. Quando as frações "1" e "2" foram submetidas a tratamento alcalino, (β -eliminação), observou-se grande destruição das unidades de ácido urônico, com subsequente formação de ácidos urônicos insaturados, mas com recuperação quase total dos

segmentos de fucose (94%), livres de ácido urônico na fração não dializável.

Estes dados são consistentes para uma cadeia principal constituída de ácido urônico com cadeias laterais formadas principalmente de fucose. A estrutura proposta para os polímeros, tipo ascofilana necessita ser confirmada por outro processo, (metilação, consumo de periodato), principalmente no que concerne a tamanho e sequência das cadeias laterais.

Os ácidos urônicos das frações 1 e 2 foram identificados por eletroforese em papel e por cromatografia de resina trocadora de ions⁵⁶, como sendo: ácido manurônico (principal), ácido gulurônico e ácido glucurônico.

A presença de ácido galacturônico, também foi sugerida para a fração 3. Estes ácidos devem ser melhor caracterizados, por carboxi-redução e subsequente análise por cromatografia gasosa e por espectrometria de massa, principalmente no que concerne ao ácido galacturônico, não observado em polissacarídeos de alga parda (Phaeophyta).

3.2. SARGASSANAS

O heteropolissacarídeo sulfatado, isolado da alga parda, Sargassum linifolium, denominado de sargassana, por ABDEL-FATTAH^{1,2,3}, era constituído de ácido D-glucurônico, D-manose, D-galactose, D-xilose e L-fucose, além de proteína e sulfato. Por hidrólise ácida parcial foram isolados três oligossacarídeos com grau de polimerização, (2-4), e de sulfatação (2 a 3), variáveis.

Os dados de metilação são compatíveis com unidades de galactose terminais não redutora, sulfatados em C-6 e dissulfatadas em C-3 e C-6. Também um dissacarídeo ácido de α -fucose (g.p.=2 e SO_3^-), contendo sulfato em C-4, (2,3-di- β -metil- α -fucose), e sulfato em C-2 ou C-4, de unidades terminais não redutoras e redutoras, respectivamente.

Os dados de metilação aliados aos de oxidação com periodato e hidrólise ácida parcial sugerem para a sargassana uma cadeia principal formada de unidades de ácido β - α -glucurônico e β - α -manose, (substituídas em C-4), a qual se ligam cadeias laterais de tamanhos variáveis de β - α -galactose, β - α -galactose 6-sulfato, β - α -galactose 3,6-dissulfatada (todas substituídas em C-4), além de α - α -fucose 4-sulfato, (substituída em C-2), e de xilose (substituída em C-3).

A pequena proporção de propano-1,2-diol detectada no hidrolisado do polialcool é indicativo de fucose substituída em C-4 e livre de sulfato. O baixo consumo de periodato (0,58 mol/mol de anidro açúcar), é compatível com o grau de sulfatação, de ramificação e de unidades substituídas em C-3).

A presença de ácidos eritrônicos e glicéricos nos produtos de hidrólise ácida do polialcool, é indicativa de ácido glucurônico substituído em C-4 e como terminal não redutor, respectivamente. Eritritol e treitol provêm de manose e galactose substituídos em C-4. Considerável percentagem de ácido urônico, manose, galactose, fucose e de xilose não foram susceptíveis à oxidação com periodato.

O tratamento alcalino da sargassana, (dessulfatação), não acarreta mudança apreciável no teor de fucose, o que é sugestivo de α -fucose 4-sulfatada.

Por outro lado a diminuição do teor de galactose é compatível com a formação de 3,6 anidro-galactose, a qual foi comprovada pelo teste do resorcinol (YAPHE)¹²⁶. O aparecimento deste anidro-açúcar é indicativo de galactose 6-sulfato no polímero, o que foi confirmado pelos dados de metilação. (2,3,4-tri- β -metil-Galp).

A sargassana diferencia-se dos polímeros tipo ascofilana por apresentarem unidades de galactose 6-sulfato e galactose 3,6-dissulfatadas.

3.3. PELVECIANAS

Pelvecianas são polissacarídeos isolados de alga parda e se diferenciam da ascofilana e sargassana, por serem desprovidas de ácido urônico e formadas quase que exclusivamente por fucose e galactose. SCHWEIGER^{107,108} isolou da alga parda Macrocystis pyrifera, um heteropolissacarídeos cuja relação fucose: galactose de 18:1, permaneceu constante após diferentes processos de purificação, embora uma pequena percentagem de xilose (0,5 a 2,5%), fosse presente no polímero purificado. O autor considera, como improvável a existência de fucanas ideais, (sulfatadas), em polissacarídeos de algas pardas.

As heterofucanas isoladas do gênero *Pelvetia*, são incluídos neste grupo. O polissacarídeo isolado por ANNO *et al*⁵.

da alga parda Pelvetia wrightii, livre de ácido algínico por tratamento com cloreto de cálcio, foi purificado por precipitação seletiva com cloreto de cetilpiridônio. O polímero, $[\alpha]_D^{20}$ -141 (c 1, água), apresenta um alto teor de fucose (51%), sulfato (36,8%) e cinza (26%), apresentando uma relação fucose: galactose de 10:1. O espectro de I.V. da fucana purificada mostra uma forte absorção em 850 cm^{-1} , indicativo de sulfato em posição axial em C-4 da fucose na conformação 1C_4 . A absorção de pequena intensidade observada em 820 cm^{-1} do espectro, I.V. sugere que o grupo sulfato também ocupe posição equatorial em carbono primário, provavelmente em C-6 da galactose.

A fucana sulfatada isolada de Pelvetia canaliculata⁵², embora conservando a característica do grupo, (Pelveciana), contém adicional quantidade de manose. O polissacarídeo purificado por precipitação fracionada com base quaternária, (livre de ácido urônico), era constituído de L -fucose, D -galactose, D -xilose e D -manose na relação de 88:7:4:1 e continha alto teor de sulfato (dois grupos sulfato por três unidades monossacarídicas). A preparação apresentava um espectro de I.V. característico de fucana: absorção em 2950 cm^{-1} (vibração de alongamento de C-H do CH_3 da fucose), em 1250 cm^{-1} , (vibração de alongamento do S=O), e 850 cm^{-1} , (forte) e 820 cm^{-1} , (ombro) correspondentes a grupos sulfatos em posições axiais e equatoriais, respectivamente.

O espectro de r.n.m.- ${}^{13}\text{C}$ apresentou dois sinais na região de C-1 (δ 99,9 e δ 95,5) com predominância do primeiro (α -ligação) e um sinal em δ 16,6 correspondente ao CH_3 da fucose, além de 5 sinais correspondentes ao carbono do ciclo.

Nenhum modelo estrutural foi sugerido para as fucanas do gênero *Pelvetia*.

3.4. FUCANAS CONTENDO ÁCIDOS URÔNICOS.

3.4.1 Padinanas

Um heteropolissacarídeo solúvel em água, $[\alpha]_D^{25} -79$ (c,1 água)], de baixo teor de sulfato (6%) e apresentando grande atividade anticoagulante, foi isolado da alga parda *Padina tetraströmática*¹⁰².

A homogeneidade do polímero, (purificado por base quaternária, cetavlon, e coluna de DEAE-celulose), foi comprovada por coluna de Sephadex G-100 e eletroforese em papel. A análise dos produtos de hidrólise ácida deste polímero (principal) mostrou uma composição química complexa, formado de (relação molar): ácido glucurônico (13,4), fucose (6,6), raminose (13,4), xilose (1,0), manose (7,6), galactose (5,1) e glucose (14,4). Uma fração insolúvel em água também foi isolada desta alga, (0,1% de rendimento), e diferia da fração solúvel por conter em adição arabinose.

O heteropolissacarídeo principal não foi investigado por processo de metilação ou outros processos que permitissem o estabelecimento de sua estrutura.

A ocorrência simultânea de fucose e raminose não é uma característica comum aos polissacarídeos de algas pardas. Considerando apenas os polissacarídeos de algas, a α -fucose é

característica de Phaeophyta, ausente em Rhodophyta e substituída por α -raminose em Chlorophyta.

O polissacarídeo isolado de alga verde, Ulva lactuca, (Ulvaceae, Chlorophyta), segundo PERCIVAL & WOLD⁹⁷, é formado de α -raminose, D -xilose, ácido glucurônico e sulfato (semi-éster). A composição química deste polissacarídeo é semelhante àquela observada nos polissacarídeos de vários gêneros da família Ulvaceae.

Um estudo estrutural mais detalhado sobre hetepolissacarídeo sulfatado da alga parda Padina pavonia foi realizado por HUSSEIN *et al.*⁴⁹ De composição química complexa (ácido D -glucurônico, D -galactose, D -glucose, D -manose, D -xilose), sua estrutura parcial foi estabelecida aliando os dados de oxidação com periodato com aqueles fornecidos pelo estudo dos fragmentos obtidos por hidrólise ácida parcial e auto-hidrólise. Deste modo foi evidenciado que a cadeia principal do polímero era constituída de unidades de ácido β - D -glucurônico, β - D -manose e β - D -glucose, (todas substituídas em C-4), na qual ligavam-se cadeias laterais de tamanho variável, formadas de β - D -galactose, β - D -galactose 3-sulfato, β - D -glucose (todas substituídas em C-4), α - L -fucose 4-sulfato e β - D -xilose (substituída em C-3).

A anomericidade das unidades do polímero foi evidenciada pela rotação ótica dos oligossacarídeos, necessitando portanto de uma melhor definição por outros processos, (r.n.m. -¹³C).

A pequena proporção de propano-1,2-diol no hidrolisado do polialcool é uma evidência que algumas unidades internas de fucose estão substituídas em C-2. O posicionamento do grupo sulfato em C-4 da α -fucose, com substituição em C-2, baseado na resistência de tal unidade à oxidação com periodato, precisa ser confirmada pela análise dos produtos de metilação do polímero metilado ou por espectroscopia de I.V. Por outro lado, a posição do grupo sulfato em C-3 da β -galactose é mais convincente, em virtude da formação de 3,6-anidro- β -galactose, por tratamento alcalino. A galactose sulfatada não sendo susceptível à oxidação com periodato exclui o sulfato em C-6 como participante da formação do anidro-galactose.

Como o heteropolímero ácido da P. pavonia é altamente complexo, sua estrutura deve ser investigada por processo de metilação, e outros processos sofisticados de análise (r.m.n.. ^{13}C).

Em resumo a composição química dos polissacarídeos do gênero Padina são bastante semelhantes, embora polissacarídeos de P. tetraströmática¹⁰² presente, em adição, raminose, não observada no de P. pavonia.⁴⁹

Os polissacarídeos da alga parda Turbinaria murrayana⁷³, (Fucp, Galp, Glcp, Manp, Xilp, GlcA) devem ser incluídos neste grupo.

4. ALGUNS ASPECTOS DA QUÍMICA DOS AÇÚCARES SULFATADOS .

O interêsse na química de açúcares sulfatados reside no fato de serem bastante dissimulados na natureza, na forma de semi-éster. Sua fórmula geral é $ROSO_3H$ onde ROH representa as unidades monossacarídicas do polímero. O grupo sulfato encontra-se ligado a muitos polissacarídeos de alga, embora também ocorra no reino animal (heparina). Para maiores esclarecimentos sobre a função, o processo de sulfatação e a separação dos derivados sulfatados consultar a revisão de TURVEY¹²¹.

4.1. INFRA-VERMELHO (I.V.)

ORR⁸⁶ em 1954 investigou os aspectos de infra-vermelho (I.V.) de vários polissacarídeos sulfatados e atribuiu a absorção em 1.240 cm^{-1} à vibração de alongamento de ligação S=O e que a absorção na região de 820 cm^{-1} e 855 cm^{-1} , (vibração de C-O-S), era dependente da configuração do grupo sulfato.

Deste modo era possível diferenciar o posicionamento do grupo sulfato equatorial e axial em polissacarídeos, pelas absorções em 820 cm^{-1} e 855 cm^{-1} , respectivamente.

Resultados semelhantes foram observados por LLOYD & DODGSON²⁰ os quais consideraram a absorção em 1.240 cm^{-1} e 1.250 cm^{-1} de S=O, como característica de todos os estéres sulfatados (semi-éster) e que a vibração da ligação C-O-S, na região de 820 cm^{-1} e 850 cm^{-1} podia ser útil no estabelecimento do posicionamento dos grupos sulfatos em polissacarídeos.

Posteriormente LLOYD *et al.*⁶⁴, , estudando mais detalhadamente vários derivados de açúcares sulfatados, atribuíram às regiões de 1.030-1.050 cm^{-1} e 770-810 cm^{-1} do espectro de I.V. às ligações de C-O e de O-S do sistema C-O-S. O posicionamento dos picos próximos à região de 800 cm^{-1} é normalmente atribuído aos grupos sulfatos de carbonos primários ou secundários em cadeias abertas ou a grupos sulfatados em carbonos secundários, em cadeias cíclicas. As hexoses 6- sulfato apresentam vibração na região de 820 cm^{-1} enquanto as hidroxilas secundárias, quando sulfatadas - como ocorre com glucose 6- sulfato - apresentam vibrações deslocadas para 832 cm^{-1} .

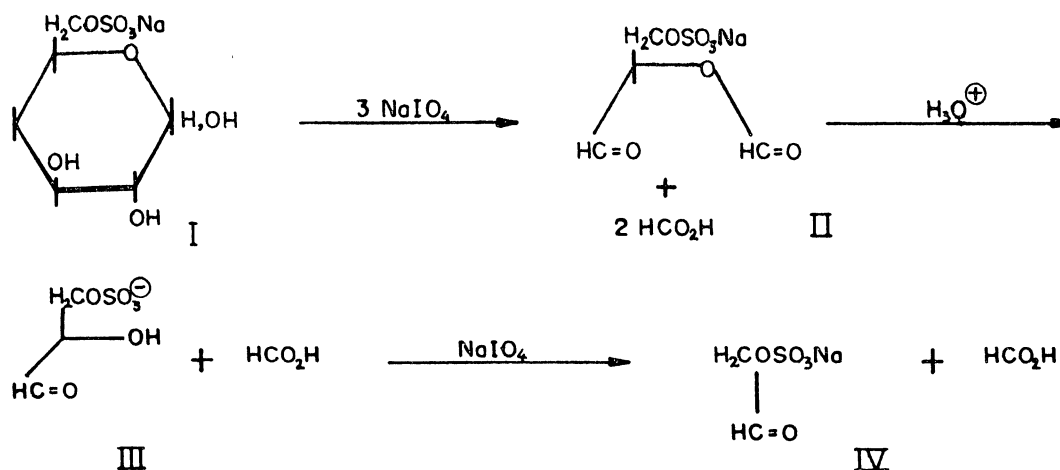
LLOYD & DODGSON⁶² estudando o espectro de I.V. de vários polissacarídeos sulfatados sugeriram que a absorção na região de 850 cm^{-1} fosse atribuída ao ester sulfato axial do carbono C-4 como ocorre com *D*-galactose em conformação 4C_1 .

ANNO *et al.*⁴, verificaram que a *L*-fucana de *Pelvetia wrightii*, contendo unidades de *L*-fucose 4-sulfato, apresentou absorções no espectro de I.V. em 1.240 cm^{-1} e 845 cm^{-1} . Este último valor de absorção deve ser atribuída ao grupo sulfato, em posição axial do carbono C-4 da *L*-fucose, mas em conformação 1C_4 . A absorção em 850 cm^{-1} é usada para assinalar o grupo sulfato em posição axial do C-2 da *L*-raminose em polissacarídeos sulfatados em conformação 1C_4 como previsto anteriormente por LLOYD *et al.*⁶⁴. Estes autores comprovaram que a absorção em 810 - 820 cm^{-1} é característica do ester sulfato em posição equatorial (conformação 4C_1) do carbono primário (C-6), enquanto a absorção em 830 cm^{-1} é atribuída a grupos sulfatos em posição equatorial (secundária). O espectro de I.V. da fucana sulfatada,

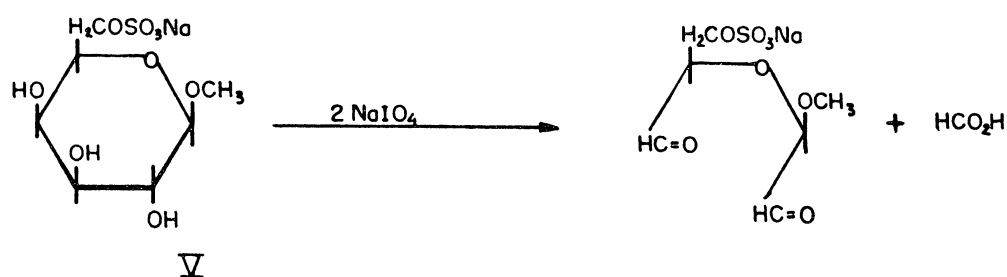
[heteropolissacarídeo, $[\alpha]_D - 79$ (água, c 1.0)], isolada da alga parda Padina tetrastromatica¹⁰² sugeria a presença de grupo carboxílico, sulfato e fucose nesta molécula. Vibrações de alongamento foram assinaladas em 2.960 cm^{-1} (pico de C-H do grupo metil da fucose); em 1.650 cm^{-1} (do grupo carboxílico); em 1.240 cm^{-1} , (S=O, do grupo sulfato). Não foi assinalado nenhum pico na região $810-850\text{ cm}^{-1}$, devido ao baixo teor de sulfato, (~ 6%).

4.2 OXIDAÇÃO COM PERIODATO.

Na oxidação com *meta*-periodato de sódio (NaIO_4) de polissacarídeos sulfatados é assumido que o grupo sulfato não interfere na oxidação, nem o processo oxidativo parece causar qualquer migração do grupo sulfato. Neste processo, ester sulfato comporta-se como simples grupo bloqueador, e o consumo de periodato depende apenas de seu posicionamento, como ocorre em "I".



β -galactose 6-sulfato (I) consome 4 moles de periodato e libera 4 moles de ácido fórmico e 1 mol de glicualdeído sulfato, (IV), por mol de hexose. A velocidade do processo oxidativo é dependente da hidrólise do ester formil. Por outro lado o derivado metil β -galactose 6-sulfato (V), consome 2 moles de NaIO_4 , com liberação de 1 mol de ácido fórmico por mol de hexose.



Em metil hexopiranosídeo ou em polissacarídeos contendo grupo sulfato em C-3 não há consumo de periodato.

Em muitos polissacarídeos, como ocorrem com as fucanas ou raminanas sulfatadas em que os esteres sulfatos estão obrigatoriamente em carbonos secundários, os resultados da oxidação com periodato são de difícil interpretação, dando resultados ambíguos com relação ao posicionamento do grupo sulfato e da ligação glicosídica.

Em fucana ideal, por exemplo, a ausência de consumo de periodato poderia indicar várias substituições alternativas na molécula: a) substituição glicosídica ou β -sulfatação no carbono C-3; b) β -sulfatação em C-4 com substituição em C-2 ou C-3; c)

substituição em C-2 com β -dissulfatação. Entretanto o pequeno consumo de periodato observado em fucanas, principalmente naquelas que se aproximam do tipo ideal, deve ser atribuído aos grupos terminais, (sulfatados ou não), ou a unidades mono-substituídas (não sulfatadas) na molécula.

Por isso, o consumo de periodato não é o método ideal para a localização do ester sulfato em fucanas.

4.3- HIDRÓLISE ÁCIDA DE ESTER SULFATO EM CARBOIDRATO.

Os açúcares sulfatados (semi-ester) são passíveis de hidrólise ácida via ligação S-O, e quando isto ocorre a configuração do açúcar original é mantida. Em condições brandas de hidrólise ácida não há evidência de migração do grupo sulfato.

Segundo TURVEY¹²², o ester sulfato equatorial em ciclohexana é mais facilmente removido por hidrólise ácida do que aquele em posição axial, e que tal seletividade também se aplica aos açúcares sulfatados na forma piranosídica. Também há evidência na literatura de que o ester sulfato primário, em anel piranosídico, é mais resistente à hidrólise ácida do que aqueles localizados em carbonos secundários. Realmente, REES¹⁰³, investigando a velocidade de hidrólise ácida, (0,25M, ácido clorídrico, à 100°), de açúcar sulfatado, incluindo polissacarídeos, diferenciou três tipos de ester sulfato: a) com tempo de meia vida maior do que 1,5 h (éster sulfato em carbono primário); b) com tempo de meia vida entre 1-1,5 h (grupo sulfato axial de carbono secundário, Galp 4-sulfato); c) com tempo de meia vida entre 0,1-0,4h (grupo sulfato equatorial em carbono secundário).

Os dados de REES¹⁰³ confirmam aqueles obtidos para o ciclohexano.

4.4. DESSULFATAÇÃO DOS ÉSTERES SULFATO POR ALCALI.

Segundo PERCIVAL & WOLD⁹⁷, nas unidades de polissacarídeos, o grupo sulfato é estável à alcali, exceto quando há grupo hidroxílico livre adjacente e *trans* ao grupo sulfato. Esta condição está presente na xilose 2-sulfato do polissacarídeo de Ulva lactuca⁹⁶ ou na L-arabinose 3-sulfato de polissacarídeo de Cladophora rupestris isolado por FISCHER & PERCIVAL²³.

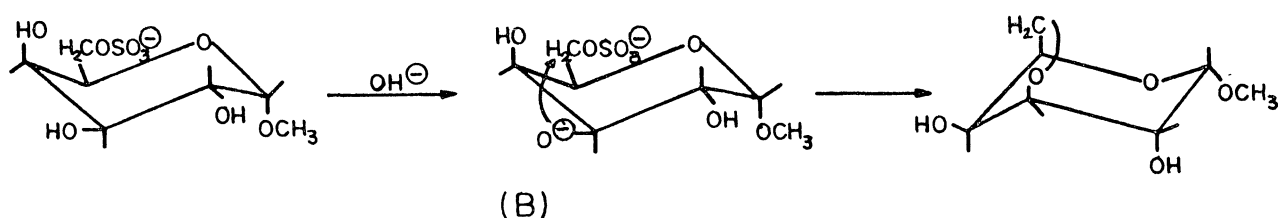
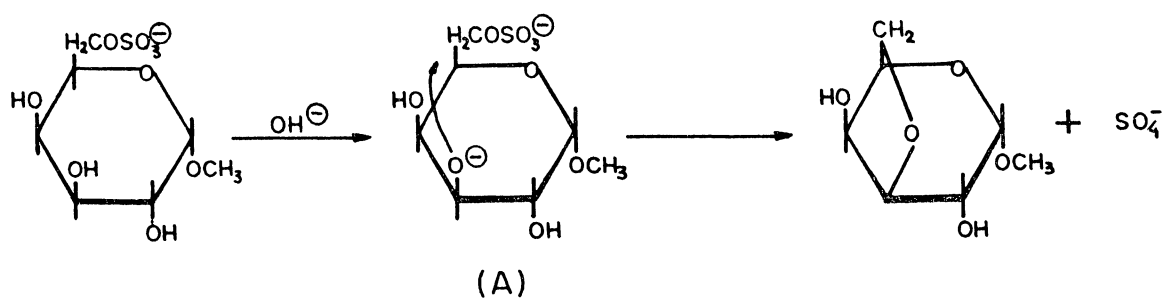
Nestes e em outros casos semelhantes o grupo sulfato é cataliticamente removido por tratamento alcalino, com inversão de Walden e formação de um epóxido. O anel de epóxido pode ser aberto por tratamento ácido ou alcalino em qualquer um de seus lados, com a formação do açúcar original (dessulfatado) e de um novo açúcar.

A abertura do anel por metóxido de sódio dá origem a dois derivados monometílicos; sendo que o ataque do grupo metoxílico se faz do lado oposto do anel. Entretanto por impedimento estérico um dos derivados do açúcar metilado é formado em maior abundância. O mecanismo desta reação é complexo e deve ser consultado em livro especializado. (Ferrier)²².

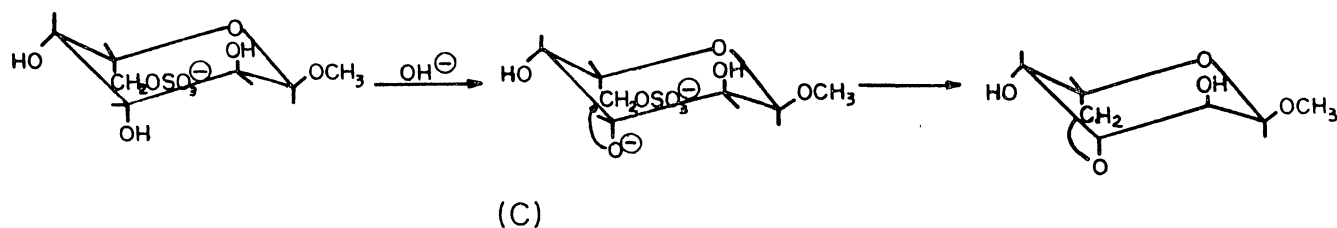
Outra possibilidade de remoção do grupo sulfato é aquela em que o sulfato está localizado no carbono C-6 ou C-3 com hidroxília livre em C-6 ou C-3, como o sulfato da carragenana⁶⁹ e

quando a remoção de tal grupo ocorre, há formação de 3,6-anidro galactose.

Tomando-se como modelo a metil β -galactose 6-sulfato a sequência de reação (A e B) demonstra que na formação do epóxido (anel 3,6-anidro) houve inversão conformacional de 4C_1 - 1C_4 .



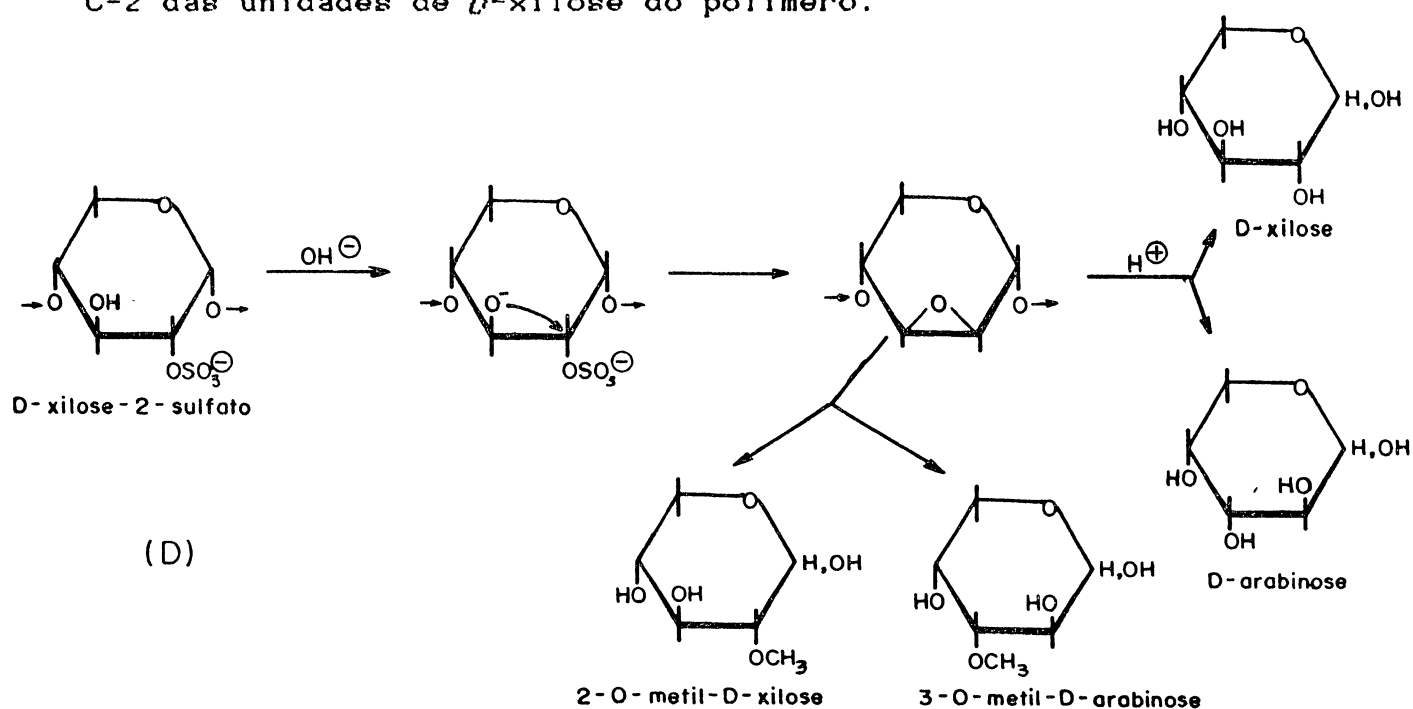
Na formação do epóxido por tratamento alcalino da metil α -L-galactose 6-sulfato não ocorre nenhuma inversão conformacional (C).



PERCIVAL & WOLD⁹⁷, investigaram o posicionamento de grupos sulfato em vários polissacarídeos de alga. O polissacarídeo sulfatado da alga verde, Ulva lactuca (Chlorophyta), era constituído de raminose, xilose, glucose e ácido urônico. Por tratamento com ácido clorídrico-metanol, grande parte do grupo sulfato foi removido e as evidências de I.V. (absorção em 850 cm^{-1}) e da oxidação com periodato antes e após dessulfatação indicam sulfatação axial em C-2 das unidades de α -raminose na provável conformação 1C_4 .

Entretanto, quando o polímero sulfato foi submetido a tratamento alcalino, (em presença de boridreto de sódio), observou-se nos produtos de hidrólise o aparecimento adicional de β -arabinose e β -xilose. Pela ação de metóxido de sódio sobre o polímero (previamente tratado com alcali), foi comprovado nos produtos de hidrólise ácida, presença de 2- β -metil-xilose como único composto monometilado.

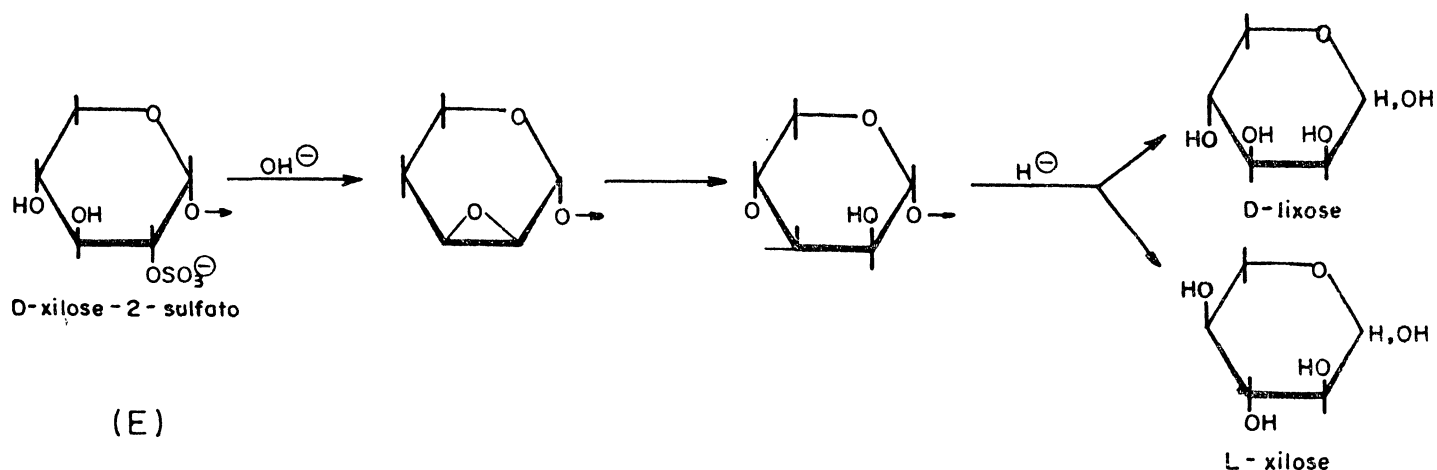
Estes dados foram interpretados conforme sequência de reação (D) como evidência do posicionamento de grupo sulfato em C-2 das unidades de β -xilose do polímero.



O derivado 2- β -metil- β -xilose foi indicativo do posicionamento do grupo sulfato em C-2 de β -xilose.

A ausência de 3- β -metil- β -xilose nos produtos de reação exclui sulfato em C-3 da β -xilose.

O aparecimento de β -lixose (traços) nos produtos de hidrólise do polímero (previamente tratado com alcali) é devido à migração do epóxido, que ocorre quando a β -xilose 2-sulfato encontra-se nas unidades terminais não redutora do polímero (E).



4.5 - OUTROS MÉTODOS DE DESSULFATAÇÃO DE GRUPOS SULFATO.

Vários processos de remoção de grupo sulfato em metil glicosídeos como acetólisis, metanólisis, dessulfatação redutiva (hidreto de lítio e alumínio) não se aplicam a dessulfatação de polissacarídeos por razões óbvias (degradação).

USOV *et al.*¹²³, aplicaram com sucesso dessulfatação em galactana de Laingia pacifica Yamada (na forma de sal de piridônio) em metil sulfóxido contendo 2% de piridina, (100° durante 9h). Nestas condições foi obtido um polímero com alto

rendimento, (90%), e baixo teor de grupo sulfato, (de 12,1% para 1,4%), sem degradação apreciável.

Uma heparina *N*-dessulfatada (SO_4^- 0,12%) foi obtida por NAGASAWA *et al.*⁷⁹, usando a dessulfatação solvolítica.

Anteriormente INOUE & NAGASAWA⁵⁰, haviam demonstrado que a heparina *N*-dessulfatada parcialmente por tratamento com metil sulfóxido contendo 5% de água, 120°, tinha sua atividade anticoagulante diminuída.

STORTZ & CEREZO¹¹⁷, verificaram a dessulfatação solvolítica e metanolítica da carragenana solúvel de alga vermelha *Iridaea undulosa*. Apesar do teor de dessulfatação solvolítica, (17%), ser inferior ao da metanolítica, (37%), a dessulfatação solvolítica acarreta, em contraste, uma pequena degradação do polímero.

4.6 - DESSULFATAÇÃO ENZIMÁTICA.

Várias enzimas foram isoladas de moluscos com capacidade de remover grupos sulfatos de carboidratos sulfatados. No Brasil os trabalhos pioneiros neste setor pertencem aos pesquisadores NADER & DIETRICH da Escola Paulista de Medicina em associação com a U.F.R.N. Estas enzimas, (genericamente denominadas de glicosulfatase), embora inespecíficas na maioria dos casos, poderiam ser de grande auxílio na elucidação estrutural dos polissacarídeos quando associados a outros

processos, (metilação).

LLOYD & LLOYD⁶³, utilizaram uma glicosulfatase para remover ester sulfato de fucana de alga parda Patela vulgata. No polímero original a velocidade de hidrólise era lenta, mas aumentava de modo acentuado em fucanas parcialmente degradadas por ácido.

A maioria das estruturas das fucanas sulfatadas até o momento estabelecidas por métodos químicos, deverão ser investigadas, num futuro próximo por métodos mais sofisticados de análise (r.m.n.⁻¹³C) na molécula original (polímero altamente purificado e homogêneo) e nos seus produtos de hidrólise parcial (Fab e espectrometria de massa).

5. ALGUNS ASPECTOS ESTRUTURAIS DE FUCANAS

As estruturas até então, propostas para as heterofucanas de algas pardas, foram baseadas em sua maior parte em dados de metilação e de hidrólise ácida parcial, com rara simultaneidade de tais estudos por ressonância nuclear magnética de ¹³C. As fucanas ácidas são moléculas complexas, constituídas de diferentes monômeros, e portanto de difícil permetilação. Algumas das estruturas propostas para estes polímeros foram baseadas apenas em dados de fragmentação ácida.

Em 1973, MIAN & PERCIVAL^{74,75}, propuseram, baseados em dados de metilação uma estrutura para as heterofucanas sulfatadas isoladas de alga parda Himanthalia lorea e Bifurcaria bifurcata; constituídas de fucose, xilose, ácido urônico, sulfato e traços

de galactose. Tais fucanas foram separadas em coluna de DE-celulose, em frações ricas em ácido glucurônico, "a", daquelas com alto teor em sulfato, "b". Os produtos de hidrólise do polímero metilado, foram analisados por c.f.g. (acetato de alditol). Na fração "a", melhores resultados foram obtidos por remetilação do polímero carboxi-reduzido. Os dados de metilação demonstraram que os derivados metilados eram comuns às duas espécies de algas investigadas, mas em proporções diferentes. Utilizando diferentes tipos de coluna, foram identificados os seguintes derivados σ -metilados: 2- σ -, 3- σ -, 3,4-di- σ - e 2,3,4-tri- σ -metil-fucitol; 2,3-di- σ - 2,3,4-tri- σ -metil-xilitol; 2,3-di- σ - e 2,3,4-tri- σ -metil-ácido-glucurônico, (2,3,6-tri- σ - e 2,3,4,6-tetra- σ -metil-glucitol no polímero carboxi-reduzido). Também foi observado a presença de fucose não metilada.

Os dados de metilação não permitem uma estrutura definitiva, mas aliados às evidências de consumo de periodato e de hidrólise parcial, sugerem para as heterofucanas de B. bifurcata e H. lorea, uma cadeia principal constituída de unidades de fucose, interligadas em C-2, (principal), e C-3, (ponto de ramificação), sendo o grupo sulfato posicionado em C-4. As unidades de xilose e ácido glucurônico estariam localizados, segundo tal modelo, na periferia da molécula como grupos terminais não redutoras ou como constituintes de cadeias laterais de tamanho variáveis. O isolamento de ácido glucurônico-(1- \rightarrow 3)-fucose (por hidrólise parcial), é indicativo de substituição no carbono C-3 das unidades da cadeia principal, pelo ácido urônico.

A maior dificuldade nestes modelos é a localização dos grupos sulfato. A estabilidade das fucanas de B. bifurcata e H.

lorea ao tratamento alcalino, bem como a absorção em 850 cm^{-1} do espectro de I.V. são indicativos de grupo sulfato axial e em posição cis à uma hidroxila vicinal, o que é provável somente para sulfatação no carbono C-4 da α -fucose, apresentando conformação 1C_4 . Anteriormente COCHIE & PERCIVAL¹⁷, já haviam previsto uma estrutura semelhante em segmentos de fucose, isolados de Fucus vesiculosus, os quais apresentavam uma cadeia principal constituída de fucose (substituída em C-2 e ramificada em C-3), A sulfatação em C-4 só foi definitivamente estabelecida por ANNO *et al.*⁴, quando isolaram a fucose 4-sulfato nos produtos de hidrólise do polímero sulfatado isolado de Pelvetia wrightii. Isto foi confirmado em fucanas de outras algas pardas.

MEDCALF & LARSEN⁷¹, isolaram da alga parda A. nodosum várias frações polissacarídicas: ascofilana, (xilofucoglucurana), uma fucogalactana e dois componentes denominados de "complexos". Tais "complexos" consistiam de uma associação de proteína, ascofilana e fucana sulfatada.

Posteriormente, MEDCALF & LARSEN⁷², degradaram esses "complexos" (C-I e C-II), por hidrólise ácida suave, (HCl 0,02 M à 80° por 1h), cujos hidrolisados foram separados por precipitação fracionada com etanol em duas frações uma tipo fucana, (F-1), e outra tipo ascofilana, contendo proteína, (F-2).

Os estudos cinéticos de hidrólise ácida destes "complexos" demonstraram que a cadeia principal era formada de fucana, a qual se ligavam várias cadeias laterais de ascofilana. Os "complexos", (C-I e C-II), diferem portanto um do outro no número de cadeias de ascofilanas associadas à cadeia principal de

fucana. Os segmentos da ascofilana, (F-2), ricos em ácidos urônicos foram degradados por β -eliminação, (tratamento com base), com formação de ácido urônico insaturado, (dialisáveis), sem degradação aparente da porção de fucana a qual foi recuperada na forma de segmentos relativamente grandes, (não dialisáveis), e livre de ácido urônico. Estes dados sugerem que a cadeia principal da ascofilana é constituída de ácido urônico com cadeias laterais formadas principalmente de fucose. O principal ácido urônico da ascofilana é ácido manurônico.

Tal acomodação estrutural da ascofilana é distinta daquela proposta por MIAN & PERCIVAL^{74,75}, para os heteropolímeros sulfatados de H. lorea e B. bifurcata.

O envolvimento de ácido urônico na cadeia principal de heterofucanas sulfatadas parece ser comum aos polímeros de algas pardas. Uma glucuromanana foi demonstrada como cadeia principal de sargassana de S. linofolium.^{1,2,3}

Os dados de metilação, oxidação com periodato e tratamento alcalino dos fragmentos de hidrólise de sargassana, eram consistentes com uma cadeia principal, composta de ácido β -D-glucurônico, (12-13 unidades, substituída em C-4) e de β -D-manose (3-4 unidades). As cadeias laterais eram formadas de: a) β -D-galactose, (2,5 unidades substituídas em C-4; sulfatadas em C-6 e dissulfatadas em C-4 e C-6; b) β -D-xilose (7 unidades, substituídas em C-3); α -L-fucose, (7 unidades), substituída em C-2 e sulfatadas em C-4.

Uma tentativa de acomodar estes dados num modelo molecular não teve sucesso. Isto demonstra que, de um modo geral,

a estrutura fina das heterofucanas de alga parda ainda não foi completamente esclarecida.

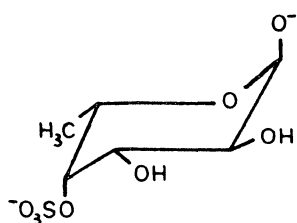
Enquanto o polissacarídeo sulfato isolado da alga parda, L. flavicans¹²⁴ apresenta uma estrutura que se aproxima de uma "fucana ideal", (homofucana), o polímero de L. nigrescens⁹³ (apresenta uma estrutura complexa, heterofucana, formada de fuc_p, Gal_p, Man_p, Xil_p, GlcA e sulfato, altamente polidispersa apresentando um P.M ~500.000. A estrutura parcial deste polímero foi estabelecida por hidrólise parcial e muitos dos aspectos estruturais foram confirmados por r.m.n.-¹³C e de ¹H, (Apêndice II).

Hidrólise do polissacarídeo, com ácido oxálico, (3h à 100°) forneceu oligossacarídeos ácidos, (contendo todos os componentes do polímero original) e um polissacarídeo de P.M ~8.000, [α]_D-13 que era formado de ácido urônico e manose. Hidrólise do polímero metilado (na forma carboxi-reduzido) forneceu 2,3,6-tri-*D*-metil-glucitol e 3,4,6-tri-*D*-metil-manitol (c.f.g.-e.m.). Uma mistura de glucuronomanana, com unidades alternativas dos dois monossacarídes foi suportada por r.m.n. ¹³C e ¹H. O polímero original de L. nigrescens é formado de uma glucuromanana com cadeias laterais complexas formadas de: a) variáveis proporções de galactose (até sete unidades), b) ácido glucurônico ligados a unidades de fucose. Não foi indicado na molécula, o posicionamento da xilose e dos grupos sulfatos. A presença de ácido urônico ligado a fucose também foi observada na ascofilana H. lorea.

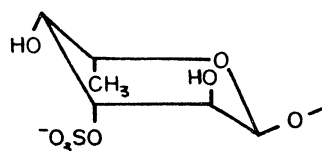
Apesar da maioria das fucanas de algas pardas (Phaeophyta), apresentarem composição química diferenciada, é possível com os dados disponíveis na literatura sugerir um modelo estrutural básico apenas para porção contendo unidades de fucose da heterofucana.

O isolamento de α -fucose 4-sulfato em hidrolisado de fucana de P. wrightii⁴ e a caracterização de 3- β -metil- α -fucose, (3/5 do total), nos produtos de hidrólise da fucana metilada de B. bifurcata e H. lorea^{74,75}, são indicativos de uma cadeia constituída de unidades α -fucose, substituída em C-2 e apresentando grupo sulfato em C-4. Os dados de I.V., (absorção em 1245 cm^{-1} , de S=O, e em 845 cm^{-1}), sugerem que o grupo sulfato esteja ligado em C-4 axial de certas unidades de fucose, provavelmente na conformação 1C_4 (I).

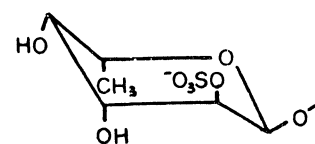
Por outro lado, CONCHIE & PERCIVAL¹⁷, detectaram 10% de grupo sulfato, (lábil à alcali), em fucana de F. vesiculosus o que é compatível com uma cadeia substituída em C-4, com grupo sulfato em C-2 ou C-3, (II e III). Isto implicaria no posicionamento de hidroxilas *trans*-vicinaís ou *trans* di-axiais, (II), numa conformação 4C_1 .



I



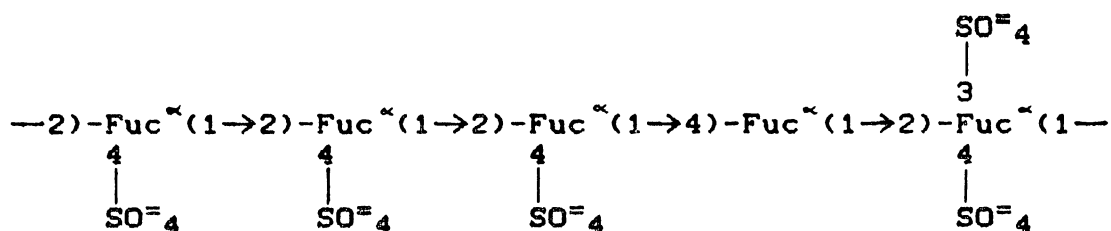
II



III

Os estudos de metilação demonstram uma percentagem, (1/5), de fucose não metilada, a qual resultaria de unidades dissulfatada ou de ponto de ramificação em C-3 de unidades da cadeia principal.

A percentagem, (1/5) de 2,3-di- β -metil-fucitol é representativo de unidades substituídas em C-4. Nos produtos de acetólise de fucana, COTE¹⁸ caracterizou, após desacetilação e redução, dois dissacarídeos que confirmam os dados de metilação: 2- β - α -L-fucopiranosil-L-fucitol e 4- β - α -L-fucopiranosil-L-fucitol, e uma pequena quantidade de um dissacarídeo substituído em C-3, o qual poderia ser derivado de pontos de ramificação. A rotação ótica, negativa, $[\alpha]_D -115^\circ$, de fucana, (*F. vesiculosus*), sugere ligação glicosídica do tipo alfa, na estrutura (IV).



Fuc = α -L-fucopiranosil

A maior dificuldade neste modelo é ajustar as substituições de unidades, (não fucose), como xilose, ácido glucurônico ou galactose como observadas em muitas fucanas.

Os métodos de extração e purificação de fucanas de algas pardas, são variados, não tendo sido estabelecido nenhuma padronização, o que dificulta, uma comparação dos dados obtidos de fucanas já investigadas.

A fucana extraída da alga parda P. canaliculata foi fracionada por KLOAREG *et al.*⁵², com base quaternária de acordo com processo utilizado por ANNO *et al.*⁵, para a purificação da fucana de P. wrightii. Utilizando tal processo estes autores obtiveram uma fucana sulfatada constituída de L -fucose, D -galactose, D -xilose e D -manose, numa relação de 88:7:4:1, mas desprovida de ácido urônico.

Um hetero-polissacarídeo, parcialmente sulfatado, com novos aspectos estruturais foi investigado por HUSSEIN *et al.*⁴⁹, da alga parda P. pavonia. Este polímero sulfatado, enquadrado no tipo "b" da classificação de KLOAREG *et al.*⁵², apresenta composição química complexa: fucose, glucose, galactose, manose, xilose e ácido glucurônico. Unidades de glucose não haviam sido assinaladas em heteropolissacarídeos de alga parda, bem como grupos sulfatos em unidades de galactose, (C-6 ou C-3). O tratamento alcalino das unidades de galactose sulfatadas levou a formação de 3,6-anidro- D -galactose, o que é comum em polissacarídeos de Rhodophyta.⁶⁹

Os dados de oxidação, hidrólise parcial e rotação ótica são compatíveis com uma cadeia principal, no polímero de P. pavonia, formada de unidades de ácido β - D -glucurônico, β - D -manose, β - D -glucose, (todas substituídas em C-4) a qual se ligam cadeias laterais de tamanho variável constituídas de β - D -galactose, (substituída em C-4); galactose sulfatada; β - D -xilose, (substituída em C-3), glucose, (substituída em C-4) e de α - L -fucose sulfatada, substituída em C-2.

ÁCIDO ALGÍNICO

1. GENERALIDADES

Todas as algas pardas, (Phaeophytas) sintetizam quantidades variáveis de ácido algínico, embora similar tipo de polissacarídeo tenha sido isolado da bactéria.

LINKER & JONES⁶¹ relataram pela primeira vez que certas cepas de Pseudomonas aeruginosa produziam um polissacarídeo com composição similar àquela de alginato parcialmente acetilado. GORIN & SPENCER²⁷ encontraram que Azotobacter vinelandii também produziam um polissacarídeo extracelular tendo a mesma composição e estrutura de um alginato parcialmente acetilado.

Ácido algínico foi isolado pela primeira vez, de algas pardas, por STANFORD¹¹³ o qual requereu uma patente em 1881 para o processo de extração e uso do alginato. Apesar do fracasso inicial o alginato constitui na atualidade um produto de grande interesse industrial devido as suas propriedades gelificantes e viscosantes.⁷⁰

As algas pardas comumente utilizadas para a extração de alginato para fins industriais, são encontradas em regiões de águas frias ou temperadas.

Vários fatores influenciam o teor de alginato nestas algas, como sazonais, inter-específicos, meio ambiente (habitat), idade e estágio de desenvolvimento, (reprodutivo ou vegetativo).

O estudo de diferentes partes da alga demonstra que o alginato é sintetizado tanto nos folíolos como nos caulóides, embora com pequena variação no teor deste poliurônideo.

Durante o período de crescimento da planta a percentagem de alginato nos caulóides de L. digitata (35 %) é mais acentuada que nos folíolos, (25 - 44 %). Tal fato também tem sido observado em L. hyperborea⁷⁶ e em várias espécies de Sargassum⁸⁷. No entanto em S. fluitans⁸⁷ tal relação é inversa, sendo de 23,4 % nos folíolos e 19,7 % nos caulóides.

Estas variações em geral tendem a diminuir quando a planta aproxima-se da maturidade, sendo que após o período de reprodução o teor de alginato decai acentuadamente.

A análise do alginato de L. digitata por dicroísmo circular¹¹⁸ demonstrou que há uma variação decrescente na relação molar M/G quando se examinou as diferentes partes da planta. Tal relação é de 1,08 nos folíolos e de 1:1 nos caulóides; 0,54:1 nos rizoides; 0,72:1 nos apressórios não fixados, (haptera) e de 0,39:1 nos apressórios fixos.

Nas algas pardas¹⁰⁴ proteínas, alginato, celulose e heterofucanas sulfatadas são os principais componentes da parede celular dessas algas. As heterofucanas estão firmemente associadas com géis de alginato e com celulose-fibrilar, o que torna difícil a separação destas macromoléculas.

Por mecanismos de hidrólise enzimática, (ainda não esclarecidos), as heterofucanas dão origem a segmentos de homofucanas que são excretadas juntamente com alginato (gel) para

os espaços intercelulares.

Na parede celular ou nos espaços intercelulares, o alginato teria função trocadora de íons e de retenção de água, de grande importância para a fisiologia da alga. Esta descrição¹⁰⁴ de parede celular de alga parda envolve dois tipos de fucanas, (hetero- e homofucanas), embora a maioria dos pesquisadores nunca tenham isolado homofucana ou fucana ideal, exceto aquela descrita por VILLAROEL & ZANLUNGO¹²⁴ para Lessonia flavicans.

Neste modelo de parede celular o alginato, sintetizado pelas algas pardas, assemelha-se a polieletrólitos aniônicos capazes de trocar cátions com aqueles da água do mar. Há evidências de que esta troca iônica é seletiva para o cálcio e em menor extensão para o sódio e o magnésio. Isto resulta na formação de complexos de cálcio insolúveis e de grande poder gelificante. Tal arranjo confere à alga grande flexibilidade e resistência a correntes marinhas, e a impetuosidade das grandes tormentas que frequentemente ocorrem no mar.

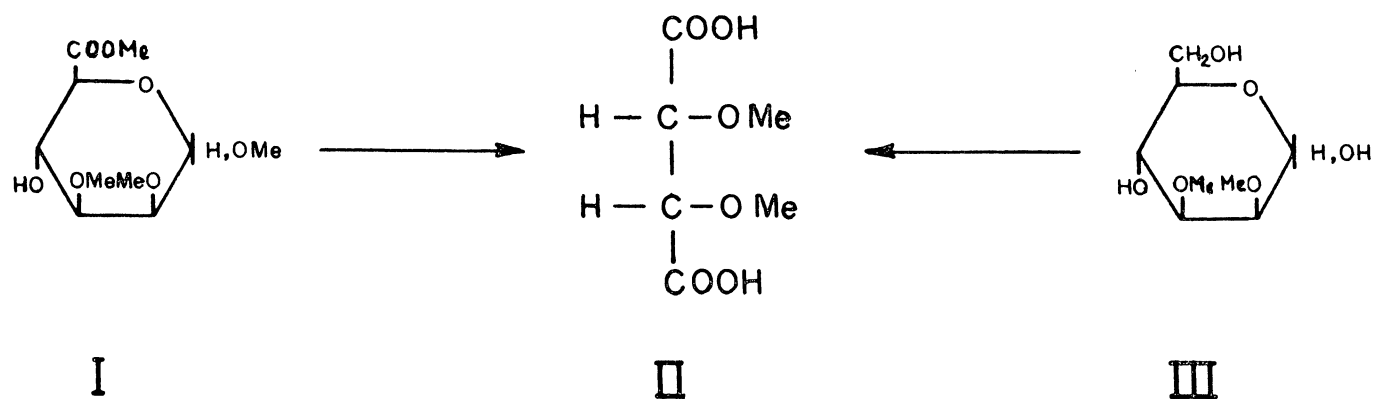
Este tipo de estrutura celular pode em parte explicar a sobrevivência de algas gigantes (Macrocystis pyrifera), que alcançam 60 - 100 metros de comprimento e conseguem sobreviver em condições tão adversas de seu habitat.

A seletividade a absorção de cálcio através da parede celular de algas é demonstrada quando se compara a relação cálcio/sódio da água do mar com aquela encontrada nas algas pardas. RAO & PRASADA *et al.*¹⁰², investigaram a composição inorgânica, (cinzas), da alga parda Padina tetrastromatica e verificaram uma relação de 232 p.p.m. de cálcio para 8 p.p.m. de sódio.

MORRIS *et al.*^{77,78}, demonstraram (*in vitro*) que as cadeias de polimanuronato não estão especificamente relacionada com as associações intercadeias ou com ligação com cátions. SMIDSRØD & HAUG¹¹¹ verificaram que a seletividade do alginato nos processos de troca iônica, envolvendo íons estrôncio, quando comparada a íons magnésio ou cálcio, envolve apenas os blocos de ácido gulurônico. O estudo das propriedades de troca iônica do polissacarídeo desacetilado de Beijerinckia indica³⁵ demonstraram não haver nenhuma seletividade na reação de troca iônica, envolvendo íons magnésio, cálcio e estrôncio, enquanto uma seletividade para o cobre foi encontrada. O mecanismo primário de associação intercadeia do alginato é via dimerização das cadeias de poliguluronato numa conformação apropriada com quelação do cálcio ou com outros cátions divalentes em sítios específicos de ligação ao longo de cada cadeia^{77,78}. Este fato demonstra que o papel do cálcio nas cadeias de alginato não é simplesmente de formar sais, mas envolve também a formação de complexos de coordenação de importância para a conformação molecular.

2. ESTRUTURA DO ÁCIDO ALGÍNICO

A primeira estrutura proposta para o ácido algínico, baseada nos dados de metilação, era a de uma cadeia linear formada apenas de ácido manurônico. Nos produtos de metanólise do polímero metilado⁴³ foi isolado o metil ester do metil 2,3-di- β -metil- β -ácido manurônico (I), o qual por degradação oxidativa dá origem ao ácido 2,3-di- β -metileritrarico, (II).



Me = CH₃

O composto III, (2,3-di-*D*-metil-*D*-manose obtido de I por redução e hidrólise também forma o mesmo produto II. Este dado juntamente com aquele de rotação ótica do polímero original $[\alpha]_{D}^{20} = +139^\circ$ era mais uma evidência de que a molécula era formada de ácido β -*D*-manurônico substituído em C-4¹⁶.

A presença de ácido *L*-gulurônico como componente do ácido algínico só foi confirmada posteriormente quando HIRST *et al.*⁴⁴ isolaram o dissacarídeo 4-*D*- β -*D*-manosil-*L*-gulose do polímero carboxi-reduzido. Isto foi confirmado por HIRST & REES⁴⁵ quando caracterizaram 2,3-di-*D*-metil-manose e 1,6-anidro-2,3-di-*D*-metil- β -*L*-gulopiranosse, (em equilíbrio com α -*L*-gulose), em alginato carboxi-reduzido.

A dificuldade inicial de incluir-se ácido gulurônico como componente da cadeia de ácido algínico foi motivada pela formação do composto (II), originar-se por degradação oxidativa de 2,3-di-*D*-manose e de 2,3-di-*D*-metil-gulose. Estes dados são compatíveis com uma estrutura heteropolimérica para o ácido

algínico, com cadeias lineares constituídas de proporções variáveis de ácido β -D-manurônico, (M) e de α -L-gulurônico, (G).

Apesar da estrutura básica de ácido algínico ser conhecida, apreciáveis variações foram observadas na relação molar M/G e no arranjo molecular das unidades formadoras do polímero. Estas variações são espécie-específicas, dependentes da estação do ano e do meio circunvizinho.

MINGHOU *et al.*⁷⁶, verificaram que a relação molar M/G em dez espécies de Sargassum variou de 0,64 - 1,53 (Tabela II).

Tabela II - RELAÇÃO M/G DE ÁCIDO ALGÍNICO OBTIDO DE PHAEOPHYTAS E BACTÉRIAS

ESPÉCIE	TÉCNICA	M/G
FUCALES		
Sargassum (10 espécies) ^a	hidrólise	0,63-1,53
<u>Fucus vesiculosus</u> ^c	hidrólise	0,75-1,20
<u>Ascophyllum nodosum</u> ^c	hidrólise	1,4 -2,5
<u>Ascophyllum nodosum</u> ^e	r.m.n.- ¹ H (bloco)	1,36-1,67
LAMINARIALES		
<u>Laminaria japonica</u> ^{ia}	hidrólise	2,26
<u>Laminaria brasiliensis</u> ^f	hidrólise	0,50
<u>Laminaria digitata</u> ^b	dicroísmo circular (bloco)	1,63
<u>Laminaria digitata</u> ^b	r.m.n.- ¹ H (bloco)	3,66
<u>Laminaria hyperborea</u> (frondes) ^c	hidrólise	1,05-1,65
<u>Laminaria hyperborea</u> ^d	r.m.n.- ¹³ C (bloco)	0,57
<u>Laminaria digitata</u> ^d	r.m.n.- ¹³ C (bloco)	1,60
<u>Laminaria digitata</u> ^c	hidrólise	1,20-1,85
<u>Laminaria hyperborea</u> ^e	r.m.n.- ¹ H	0,21
<u>Laminaria hyperborea</u> ^e	dicroísmo circular (bloco)	0,21
<u>Macrocystis pyrifera</u> ^e	r.m.n.- ¹ H (bloco)	2,29
BACTÉRIA		
<u>Azotobacter vinelandii</u> ^g	hidrólise	11,0
<u>Beijerinckia indica</u> ^h	hidrólise	só gulurônico

Referências número:

a - 76; b - 118; c - 96; d - 30; e - 90; f - 81; g - 27; h - 35.

3. BIOSÍNTESE DE ÁCIDO ALGÍNICO

Estudos sobre alginato de Azotobacter vinelandii^{27,55,61} demonstraram que o polímero é parcialmente acetilado (5,2 grupos acetil/ácido hexurônico anidro) e que este polissacarídeo é inicialmente sintetizado como poli- β -manurônico (relação M/G de 11:1) o qual é subsequentemente convertido a guluronato pela enzima, epimerase C-5. Identificação da atividade de epimerase C-5 por MADEWICK *et al.*⁶⁷ em tecido de alga parda de Pelvetia canaliculata, sugere um mecanismo análogo para biossíntese do alginato de algas.

A conversão parcial de polimanuronato em poliguluronato é dependente de cálcio. HAUG e LARSEN³⁴ demonstraram que a relação M/G de alginato de A. vinelandii em culturas sem adição de cálcio era de 3,75:1 e que decrescia para 1,5:1 em presença de cálcio (3,4 mM). Alginato de A. vinelandii foi fracionado após hidrólise parcial, (HCl 0,3 M por 2 h à 100°), em blocos M e blocos G. Alginato incubado com epimerase C-5 foi submetido ao mesmo processo de separação (hidrólise). A relação molar M/G foi de 7,74 na ausência da enzima e de 0,33 após incubação enzimática.

Tal fato demonstra claramente a interconversão enzimática destes blocos. Entretanto não está bem esclarecido papel desta enzima (epimerase C-5) em polímeros que só contenham ácido gulurônico, como ocorre no polissacarídeo extracelular de B. indica investigado por HAUG & LARSEN³⁵.

HAUG & LARSEN³⁶ reestudando a biossíntese do alginato de A. vinelandii constataram que a produção do poliurônido em

meio de cultura contendo glucose, é bastante aumentada pela adição de acetato e que a relação dos ácido urônicos é dependente da concentração de cálcio adicionada ao meio de cultura.

HAUG & LARSEN³⁷ demonstraram que alginato, (polímero), de alga parda também é epimerizado enzimaticamente, (epimerase C-5), em presença de cálcio. Nestas condições, utilizando somente blocos de ácido polimanurônico, verificaram que são formados blocos homopoliméricos de ácido gulurônico e blocos contendo sequência alternada de ambos os ácidos, e que nenhuma transformação do bloco misto em homogulurônico ocorria.

Embora a epimerização do bloco M em bloco G ocorra, tal fato não evidencia que este seja o único mecanismo de biossíntese de alginato em alga parda.

A biossíntese de alginato em alga parda é influenciada por fatores externos. A incorporação de ¹⁴C no alginato de L. digitata³⁴ foi mais acentuada nos blocos M (separação após hidrólise parcial) em presença de luz, mas quando a reação se processa no escuro, a incorporação não foi tão intensa, havendo ainda incorporação em ambos os blocos. Em L. brasiliensis não foi investigado a influência da luz na biossíntese do alginato. No entanto, vale ressaltar que o habitat destas algas é a grande profundidade, de 40 - 120 metros segundo OLIVEIRA FILHO^{82,83,84}, onde somente raios luminosos de pequeno comprimento de onda são disponíveis para os processos fotossintéticos.

LARSEN & HAUG⁵⁵ verificaram que a incubação de ácido polimanurônico em presença de água tritiada e de epimerase C-5, isolada de Azotobacter vinelandii, conduziu a incorporação de

tritio no polímero. A hidrólise ácida do alginato modificado pela enzima seguido de separação dos ácidos urônicos demonstrou a conversão enzimática do ácido β -manurônico em L -gulurônico e que 92 % do tritio estava presente no ácido L -gulurônico e apenas 8 % no ácido β -manurônico. Estes resultados sugerem que a primeira etapa na reação de epimerização ocorre com a remoção de um átomo de hidrogênio de C-5 do ácido urônico. Este fato está em acordo com outras reações de epimerização em que a remoção do átomo de hidrogênio ocorre em carbono adjacente à grupos carboxílicos ou carbonílicos.

Não resta dúvida que *in vitro*, a epimerase C-5 é capaz de converter blocos M em blocos G em presença de cálcio, mas seria surpreendente se este fosse um mecanismo eficiente de biossíntese de ácido alginico. É conhecido que a biossíntese do ácido manurônico em alga tem como precursor o β -manitol (em presença de GTP e NAD).

QUILLET & LESTANG-BREMOND¹⁰¹ sugeriram um mecanismo alternativo para a biossíntese de alginato em algas pardas, a partir de β -sorbitol. β -[U-¹⁴C] sorbitol 6-fosfato injetado nas extremidades de espécimes de Sargassum muticum jovens e em fase de crescimento é transformado dentro de poucas horas em ácido L -gulurônico radioativo. Após 24 horas apenas os blocos G e os híbridos (MG), mas só nas unidades de ácido gulurônico, apresentavam-se marcados. Após 72 horas os blocos M permaneciam sem marcação, mas a unidade M dos blocos híbridos apresentavam radioatividade. Tal fato sugere que parte do ácido gulurônico recém sintetizado foi convertido em ácido manurônico radioativo, muito provavelmente pela ação da epimerase C-5 operando numa atividade enzimática reversível de ácido gulurônico para ácido

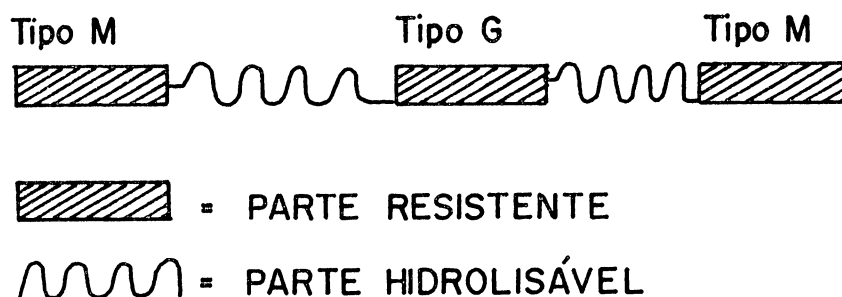
manurônico. A isomerização de gulurônico para manurônico requer ATP, o qual é fornecido pela alga. Esta fonte de energia estava obviamente ausente nos experimentos *in vitro* realizados por HAUG & LARSEN^{36,37}, o que explica apenas a conversão de ácido manurônico em ácido gulurônico.

Portanto, é admissível que em algas pardas a epimerase C-5 atua regulando reversivelmente o teor de ácido manurônico e gulurônico em alginatos recém sintetizados. Tal mecanismo de síntese de alginato não é observado em Azotobacter vinelandii desde que sorbitol não foi ainda isolado deste organismo.

4. HIDRÓLISE PARCIAL DE ÁCIDO ALGÍNICO

É conhecido que o ácido algínico de algas pardas é formado de blocos homopoliméricos constituído de ácido β -D-manurônico (blocos M) e ácido α -L-gulurônico (blocos G) com intercalação de zonas híbridas (blocos M/G), conforme modelo proposto por HAUG *et al.*³⁸

MODELO DE ÁCIDO ALGÍNICO



A relação dos blocos M e blocos G, (blocos M/G), o grau de polimerização e o arranjo molecular destes blocos caracterizam o tipo molecular do poliurônideo.

O processo comumente utilizado na separação de tais blocos é aquele descrito por HAUG *et al.*³⁸ utilizando hidrólise parcial do ácido algínico seguido de precipitação fracionada dos blocos M e blocos G em pH 2,85. Os blocos M e G são obtidos numa pureza de 80 - 90 % por esta técnica.

O processo utilizado para a separação dos blocos M e G de L. brasiliensis foi semelhante ao de HAUG *et al.*³⁸ mas modificado para a eliminação de impurezas, (sais), por diálise ("cutoff" 3500) e por purificação com base quaternária, (cetavlon).

A sequência dos ácidos urônicos em alginato tem sido estabelecida nos blocos homopoliméricos M e G, obtidos por hidrólise ácida parcial. Os métodos para a determinação dos ácidos urônicos nesses blocos, como carbazol e fenol-ácido sulfúrico superestimam o valor do ácido gulurônico, o que conduz a uma determinação da relação M/G menor do que a real.

A espectroscopia de r.m.n.-¹H tem sido utilizada como um processo de maior eficiência no estabelecimento da relação M/G nos blocos homopoliméricos isolados dos hidrolisados de alginato.

PENMAN & SANDERSON⁹⁰ estabeleceram a configuração do próton anomérico do ácido β -D-manosidurônico, (H-1 orientado axialmente, em ⁴C₁, τ 5,46). Por outro lado no espectro do ácido poligulurônico bem como no do ácido α -L-gulurônico o próton anomérico (τ 4,96) ressoa num campo mais baixo, indicando que este próton tem uma orientação equatorial, (¹C₄). Para o sinal do H-5 nas unidades de ácido α -L-gulosidurônico foi atribuído um valor de τ = 5,56. A relação dos blocos M/G foi obtida por

espectroscopia r.m.n.- ^1H pela intensidade dos sinais de H-1 do ácido manosidurônico e de H-1 do ácido gulosidurônico ou pela relação da intensidade dos sinais de H-1 do ácido manosidurônico e H-5 do ácido gulosidurônico. Por ambos os processos os resultados foram semelhantes, de acordo com PENMAN & SANDERSON. A relação dos blocos M/G para o alginato de L. hyperborea foi de 0,21:1 enquanto que para Macrocystis pyrifera a relação foi 2,29:1. Valores variáveis de 1,36 - 1,67:1 foram observados para o polímero de Ascophyllum nodosum.

As conformações $^4\text{C}_1$ para o ácido β -D-manosidurônico e $^1\text{C}_4$ para o ácido α -L-gulosidurônico assinaladas pelos autores anteriormente citados, foram confirmadas por GRASDALEN *et al.*³⁰ investigando o alginato de L. hyperborea e L. digitata por r.m.n.- ^{13}C . Os valores da relação dos blocos M/G obtidos para L. hyperborea e L. digitata foram de 0,57:1 e 1,60:1, respectivamente.

BOYD & TURVEY¹³ aplicaram a espectroscopia de r.m.n.- ^{13}C na identificação de oligossacarídeos insaturados, os quais foram obtidos por tratamento de ácido algínico com a enzima α -L-guluronato liase. Assim foi diferenciado o oligo Δ -gul μ A-gul μ A (δ 94,3; 102,4 e 108,8) do Δ -man μ A-gul μ A (δ 94,3; 101,2 e 108,8). O valor de δ 108,8 foi atribuído ao grupo insaturado. GRASDALEN *et al.*²⁹, demonstraram que o espectro de r.m.n.- ^{13}C de diversos alginatos contém multipletes que refletem a sequência das unidades ácidas e que a sequência das unidades monoméricas, L-guluronato e D-manuronato, influenciam marcadamente o valor dos deslocamentos químicos²⁸.

Devido ao interesse industrial dos alginatos e a grande variação no teor deste poliuronídeo em diferentes espécies de alga parda, torna-se necessário um estudo deste polissacarídeo em algas de interesse industrial, como é o caso da Laminaria brasiliensis descrita por JOLY & OLIVEIRA⁸⁴.

Como a estrutura fina do alginato e de fucana em L. brasiliensis ainda não foi esclarecida, a finalidade do presente trabalho foi a de estudar os polissacarídeos ácidos de L. brasiliensis por métodos químicos e físicos.

II MATERIAL E MÉTODOS

1. METODOLOGIA GERAL

As rotações óticas foram obtidas em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 141 à temperatura de 25°.

Açúcar total, pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*²¹), utilizando como padrões: L-fucose, D-galactose e ácido glucurônico.

Ácidos urônicos, segundo método do carbazol utilizando como padrão solução de ácido glucurônico.¹²

Proteínas, com o reagente de Folin Ciocalteu segundo processo de LOWRY *et al.*⁶⁵, utilizando solução de soro albumina bovina cristalina como padrão.

Grupo sulfato foi determinado pelo método da gelatina-bário, após hidrólise do carboidrato com HCl, (1N por 5h à 100°), segundo método descrito por DODGSON & PRICE²⁰.

Carboidrato redutor foi determinado pelos métodos de SOMOGYI-NELSON¹¹² e PARK & JOHNSON⁸⁹ para a determinação do peso molecular médio, (PMm), das frações de baixo peso molecular.

Determinação de 1,6-anidro-galactose foi realizada pelo método do resorcinol segundo YAPHE¹²⁶, utilizando padrão de 1,6 anidro-galactose.

O peso seco das amostras foi determinado em estufa à 100°, até peso constante.

Para medida de pH foi utilizado potenciômetro Micronal.

As centrifugações para o fracionamento de polissacarídeos foram realizadas em centrífuga Sorvall super-speed modelo SS-1 e Beckmann J2-21.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrômetro Beckmann DU e Micronal B380.

Evaporação à pressão reduzida foi realizada em evaporador Fisaton modelo 802, e em temperaturas ~40°.

1.1. TITULOMETRIA

As determinações do consumo de *meta*-periodato de sódio foram realizadas de acordo com o processo descrito por NEUMULLER & VASSEUR⁸⁰.

Ácido fórmico liberado na oxidação com *meta*-periodato de sódio foi determinado por titulação com hidróxido de sódio 0,01 M em atmosfera de nitrogênio, usando fenolftaleína como indicador.

1.2. ANÁLISE DE INFRAVERMELHO (I.V.)

A análise de I.V. foi realizada em aparelho Beckmann modelo Acculab 10, utilizando o polissacarídeo (3-5 mg), após secagem em aparelho de Abderhalden contendo P₂O₅ à 60°, na forma

de pastilha (KBr) ou polissacarídeo na forma de película.

1.3. MÉTODOS CROMATOGRAFICOS E ELETROFORÉTICOS

A cromatografia em papel, (c.p.), foi realizada em papel Whatmann nº 1, com o seguinte sistemas de solventes:

a) benzeno-*f*-butanol-piridina-água, (1:5:3:3); b) *f*-butanol-ácido acético-água, (50:12:25); c) acetato de etila-piridina-ácido acético-água, (5:5:1:3); d) acetona-etanol-alcool isopropílico-tampão borato 0,005M pH=10, (3:1:2:2).

Os açúcares foram visualizados com: I - nitrato de prata alcalino¹²; II - cloridrato de *p*-anisidina⁴⁶, seguido de aquecimento à 105°. A migração cromatográfica dos carboidratos foi relacionada à da *D*-glucose (R_{glc}) ou à do ácido glucurônico (R_{glcA}).

A eletroforese em papel dos produtos de hidrólise ácida parcial do alginato e da fucana de *L. brasiliensis*, foi realizada em cuba de imersão contendo tetracloreto de carbono como refrigerante, com uma diferença de potencial de 1750 V correspondendo à passagem de corrente de ~15 mA, em papel Whatmann nº 1, por 45 minutos.

Foi utilizado como tampão eletroforético solução de: III - ácido acético 0,1M-piridina à pH 6,5 e IV - tampão borato 0,01M pH 9,2 contendo 0,005 M de cloreto de cálcio³².

1.4. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (c.f.g.)

As análises por c.f.g. foram realizadas em :

a - cromatógrafo Hewlett Packed, modelo 5890 com detector de ionização de chama (250°) e injetor (220 - 250°), nitrogênio como gás de arraste. Coluna (I), capilar de sílica fundida, (30m X 0,25mm de d.i.), SP 2340, (0,20mm), em diferentes temperaturas: 230° (acetatos de alditóis); 205° (glicosídeos acetilados); programação de temperatura, 150 - 200°, 4°/min. (acetatos de alditóis); 190° (acetatos de alditóis parcialmente metilados).

Temperatura do injetor (220-250°) e do detector (250°). O tempo de retenção (T), foi relacionado ao glucitol hexa- β -acetato ou ao 1,5-di- β -acetil-2,3,4,6-tetra- β -metil- β -glucopiranosídeo. As percentagens foram obtidas por integração automática.

b - cromatógrafo Hewlett Packed, modelo 5840 A com detector de ionização de chama, hélio como gás de arraste (20 ml/min) com um "split" de 100:1; coluna (II), (200 x 0,15 cm de d.i.), ECNSS-M à 3% p/p sobre gás Chrom Q, à temperatura de 170°, (acetatos de alditóis parcialmente metilados). As temperaturas do injetor e do detector foram de 190° e 230°, respectivamente. Coluna "I", como descrito anteriormente no item "a".

c - Cromatógrafo Varian, modelo 2440 com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste. Foi utilizado a coluna "II" descrita no ítem "a", e IV - Coluna de OV-225 à 3% (p/p) sobre gás Chrom Q, com fluxo de nitrogênio

de 40 ml/min e temperaturas do injetor e detector de 190-220° e 220-240°, respectivamente. Temperatura da coluna: 170°, (acetatos de alditóis parcialmente metilados), e 205°, (acetatos de alditóis).

1.5. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (c.f.g. - e.m.)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectroscopia de massa foram realizadas em aparelhos a - Finnigan, modelo 4000, (Incos 300) e b - MAT CH 7A, (MAT 166), equipados com coluna capilar, (V), de sílica fundida (30m X 0,25mm de d.i.), respectivamente. Os espectros foram obtidos por impacto de eletrons repetitivamente a cada 2s, desde 40 à 420 m/z em "a" ou 40 à 395 m/z em "b".

As amostras foram injetadas na coluna "V" à 50°, utilizando a técnica de "split" e então a temperatura foi programada à 40°/min até 220° e mantida constante. Para a coluna "I" foi utilizada a programação de 120->200°, 4°/min.

Hélio foi utilizado como gás de arraste com velocidade linear de 22cm/s. A coluna V, foi utilizada para a análise de acetatos de alditóis e 1,6 anidro- β - α -gulose, e a coluna II para os derivados acetilados parcialmente metilados.

1.6. RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (r.m.n. ^{13}C)

Foram utilizados os seguintes tipos de aparelhos para a análise de r.m.n. ^{13}C , acoplados ao transformador de FOURIER: Espectrômetros BRUKER AM-360WB, AM-300WB e 25WB. As soluções contendo os polissacarídeos, (50-160mg) em D_2O ou D_2O contendo NaOH 1%, foram colocados em tubos (200 - 10mm de d.i.), e examinadas à temperatura de 33 ou 25°. Os deslocamentos químicos foram expressos em (p.p.m.), relativos à ressonância do T.M.S. ou T.P.S., deteminados em experimento distinto.

1.7. METILAÇÃO

As metilações dos polissacarídeos ácidos, (fucana e ácido algínico), isolados de L. brasiliensis, foram metilados pelo método de HAWORTH⁴⁸ e/ou HAKOMORI⁴⁷.

2. POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS DE L. brasiliensis: ÁCIDO ALGÍNICO E FUCANA.

2.1. Local de Coleta:

L. brasiliensis foi coletada no mês de abril de 1983, no litoral do Estado do Espírito Santo, Brasil. Uma parte da alga, recém coletada, foi congelada, (0-4°) e posteriormente conservadas à baixa temperatura (-15°), até sua utilização. A outra parte foi seca ao sol, moída (moinho de faca) e conservada

à pressão reduzida.

2.2. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE L. BRASILIENSIS.

2.2.1. Despigmentação e delipidificação.

Alga seca (330g, 79% p.s.) foi extraída sucessivamente com uma mistura de: a) acetona-metanol-clorofórmio, (2:1:1;200ml) e b) acetona-metanol-acetato de etila-clorofórmio, (2:0,5:0,5 :1,200ml) (Soxhlet) por 24 horas. Após filtração, o resíduo delipidificado e livre da maioria dos sais e pigmentos foi denominado de resíduo R-I. Os solventes foram reunidos e evaporados à pressão reduzida e tratado com clorofórmio, o qual foi seco com sulfato de amônio anidro (=fração lipídica, F.L. =6,5g).

2.2.2. EXTRAÇÃO DE MANITOL

O resíduo R-I obtido na etapa anterior, foi extraído com solução de metanol à 85%, (v/v), (1 litro, 4X, 100°), sob refluxo. Os filtrados metanólicos foram reunidos, evaporados à pressão reduzida e tratados com etanol. O manitol, foi purificado em coluna trocadora de íons, (dowex 50 x 8 e amberlite IR-4B eluição com água), e despigmentado por passagem em coluna de carvão celite, (eluição com água). O manitol foi obtido em estado cristalino, (20g), tendo um T igual ao de uma amostra padrão de manitol, (c.f.g., coluna IV), e p.f.= 166°). O resíduo obtido após tratamento metanólico foi tratado com acetona anidra e seco

à temperatura ambiente. O pó cetônico obtido foi denominado de resíduo R-II, (267,5g, 80,6% p.s.).

2.2.3. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS EM ÁGUA.

O resíduo R-II (267,5g) foi extraído com água (4 l, 4X à 99° por 6 horas). Os filtrados aquosos foram reunidos e evaporados à pressão reduzida até um volume de ~ 500 ml e tratado com etanol (3 volumes). Após centrifugação, o precipitado foi tratado com acetona anidra (150ml, 3X) e seco à temperatura ambiente, correspondendo a fração de fucana bruta (=F.B., 51,5g 78% p.s.). O resíduo obtido após extração aquosa contendo ácido algínico foi denominado de R-III.

2.2.4. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L.brasiiliensis POR TRATAMENTO COM ALCALI.

O resíduo R-III, obtido após extração aquosa, foi tratado com solução de carbonato de sódio 0,25%, (6 litros), e homogeneizado em liquidificador. A mistura permaneceu à temperatura ambiente por 35 h. Após filtração o resíduo obtido foi submetido por mais duas vezes a tratamento com carbonato de sódio (0,25%, 7 litros por 50h e 0,25%, 4 litros por 35 horas). Os filtrados alcalinos (R-VI-A; R-VI-B, e R-VI-C, sequencialmente obtidos por tratamento alcalino) foram tratados com solução de CaCl₂ 0,5M sob agitação constante, (liquidificador). Os respectivos alginatos de cálcio recuperados após filtração foram suspensos em água e tratados com solução de ácido clorídrico, (2 litros), até pH=2, filtrados e os resíduos foram lavados com

solução de ácido clorídrico pH=2 (2 litros), até ficar livre de cálcio (teste com ácido oxálico). Após esta verificação o ácido algínico foi lavado com água destilada até pH 4 - 5, suspenso em água e tratado com solução de carbonato de sódio até pH=7. O alginato de sódio, obtido após centrifugação (10.000g, 20min.), foi precipitado com etanol, (3v), centrifugado e o precipitado desta centrifugação foi tratado com acetona (200ml, 3X), e seco a temperatura ambiente. Rendimento: R-VI-A=35g (82,4% p.s.); R-VI-B=25g (80,8% p.s.); e R-VI-C=25g (81,8% p.s.).

2.3 - PURIFICAÇÃO DA FUCANA BRUTA (F.B.) de L. brasiliensis

2.3.1. DESPROTEINIZAÇÃO DA FUCANA F.B.

A fucana (F.B.=51,5g, 10,9% proteína) foi suspensa em tampão, (ácido acético-acetato de amônio 0,2M, pH=8,5) e tratada com enzima proteolítica (sigma tipo VII); tolueno, (2ml), foi acrescentado como preservante. A mistura desproteinizante foi mantida à 28° por 8 dias com acréscimo de pequenas porções de enzima, (20mg), a cada 40 horas. A suspensão foi desproteinizada, (5X), com uma mistura de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 17:50 para cada 250 ml de amostra; de acordo com o método de Sevag descrito por STAUB¹⁴. Após precipitação com etanol, (3v), e centrifugação a fucana foi dialisada contra água destilada (5X, 1 litro), reprecipitada com etanol, e seca com acetona (~ 17g; 2% de proteína).

2.3.2. PURIFICAÇÃO DA FUCANA COM CLORETO DE CÁLCIO E CETAVLON.

A fucana após tratamento desproteinizante foi solubilizada em água, (1200ml), e tratado com cloreto de cálcio 4M, (200ml), sob agitação magnética. Após centrifugação, o alginato de cálcio precipitado, foi tratado com solução de ácido clorídrico pH=2, (500ml, 2X, sob agitação magnética), filtrado e lavado com água até pH ~ 4 - 5. O ácido algínico foi transformado em alginato de sódio por tratamento com solução de carbonato de sódio até pH=7, (11,3g 82% p.s.). O sobrenadante obtido após tratamento com cloreto de cálcio, foi tratado com brometo de cetiltrimetil amonio, (cetavlon, 5%, 200ml à pH=7), fornecendo desta maneira uma concentração de cloreto de cálcio 0,5N. O sistema foi mantido em repouso por 48h à 30°. O complexo fucana-cetavlon obtido por centrifugação foi dissolvido em uma solução de cloreto de cálcio, (3M, 400ml), centrifugado para remoção de pequena quantidade de material insolúvel e precipitado pela adição de etanol, (3v). Este processo foi repetido por mais duas vezes, sendo então a fucana dialisada com água destilada (5 X 0,4 litros), e precipitada com etanol (3v). Após solubilização em água e centrifugação (10.000g por 20 min.), o precipitado foi tratado com acetona e seco à temperatura ambiente (= fucana purificada, F.P.=5,14g; 96,5% p.s.).

2.3.3. PURIFICAÇÃO DA FUCANA F.P. POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

A fucana F.P., (1g), foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE-celulose, (65 X 3cm de d.i.), forma Cl^- , utilizando o seguinte sistema de eluição: a - lavagem com água destilada; b - eluição com solução de cloreto de potássio, 0,25M (1,5 litros); 0,5M (3 litros); 0,75M (4 litros) e 1M, (2,0 litros). Cada etapa de eluição foi precedida até análise para carboidrato total negativa. As frações obtidas foram concentradas parcialmente (evaporação à pressão reduzida), dialisadas, precipitadas com etanol (3v), tratadas com acetona e secas à temperatura ambiente. As sub-frações obtidas: F-H₂O, F-025, F-050, F-075 e F-100; conforme tenham sido eluídas com solução de KCl, foram hidrolisadas, (T.F.A 1N por 3h 100°), e analisadas por c.f.g. (coluna I), na forma de acetatos de alditóis. Determinou-se carboidrato total, sulfato (SO_4^-), ácidos urônicos e proteína, nestas frações. A fração majoritária, (F-0,75, 71% de rendimento), foi escolhida para a realização de estudos estruturais.

2.4. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DA FUCANA F-075

Para a determinação do tempo ótimo de hidrólise da fucana F-0,75 foi utilizado ácido trifluoracético, em concentração, (0,25N, 0,50N, 1N e 2N) e tempo, (0,5 - 24 horas), variáveis. Após hidrólise e ajuste do pH = 8 - 9 (carbonato de sódio), foi dosado açúcar total e açúcar redutor. O acompanhamento da hidrólise também foi realizado por c.f.g. e c.p., (solvente a; visualizador I).

2.5. CARBOXI-REDUÇÃO DA FRAÇÃO F-075

A carboxi-redução da fucana F-075 foi realizada de acordo com o método de TAYLOR & CONRAD¹¹⁹, realizando-se, no entanto, o controle do pH do meio de reação¹¹⁶ pela utilização de soluções tampão como descrito a seguir:

Uma amostra (100mg) da fucana F-075 foi dissolvida em tampão M.E.S., 0,2M, pH=4,75. Foram adicionadas pequenas porções de carbodiimida, E.D.C., na proporção de 1 milimol de carbodiimida: 50 microequivalentes de ácido (~ 190mg de E.D.C. acrescentada por um período de 1 hora). A solução permaneceu sob agitação magnética por 1 hora à temperatura ambiente. O meio de reação foi ajustado à pH=7 pela adição de tampão TES 0,2M, pH=7,0. Boridreto de sódio foi adicionado, (em pequenas porções), de modo a obter uma solução 2M, (~2g), sob agitação magnética constante. A solução permaneceu por 2h à 50°, dialisada e liofilizada, (80% de rendimento).

Uma amostra de fucana carboxi-reduzida, (F-075-EDC), foi hidrolisada, (T.F.A. 1N por 3h à 100°), e analisada por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis. Determinou-se o teor de carboidrato total e sulfato nesta fração.

2.6. CONSUMO DE META-PERIODATO DE SÓDIO E ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO DA FUCANA F-075.

2.6.1. OXIDAÇÃO

Uma amostra, (73mg), da fração F-075 foi submetida à oxidação com meta-periodato de sódio 0,01M, (100ml), na ausência de luz durante 96 horas, à temperatura de 0 - 2°. A reação foi acompanhada por experimento controle onde metil- β -D-galactopiranosídeo foi submetido à oxidação nas mesmas condições descritas. Alíquotas de 1ml das soluções oxidantes foram retiradas em intervalos de tempo diferentes para a determinação do consumo de periodato⁸⁰.

Após 96 horas de reação, o excesso de meta-periodato foi eliminado pela adição de etileno glicol, (3ml). A solução contendo o polissacarídeo oxidado foi dialisada contra água corrente por 48 horas, liofilizada e o polissacarídeo, foi tratado com boridreto de sódio (48 horas). O excesso de boridreto foi eliminado, (solução de ácido acético 2N), e a solução foi dialisada e liofilizada, (81,5 % de rendimento).

2.6.2. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE NaIO_4

O consumo de meta-periodato de sódio foi determinado pela titulação de uma alíquota (1ml), retirada da solução oxidante após 150 horas de reação, utilizando solução padronizada de tiossulfato de sódio 0,005M, como titulante e amido a 1% como

indicador. O consumo expresso em termos de mol de hexose anidra foi calculado através da seguinte expressão.

$$C = \frac{(B-A) \cdot V_t \text{ da solução oxidante} \cdot M' \cdot X \cdot PM}{\text{alíquota titulada (ml)} \cdot \text{amostra (mg)} \cdot 1000}$$

onde:

M = molaridade da solução oxidante

A = ml de tiosulfato de sódio 0,01N gastos para a titulação de alíquotas da solução oxidante que continha a amostra.

M' = molaridade da solução de tiosulfato de sódio padronizada.

PM' = peso molecular médio dos açúcares constituintes do polissacarídeo, calculado em função da composição química percentual.

C = consumo de *meta*-periodato de sódio por mol de açúcar anidro.

Através dos dados de consumo de *meta*-periodato de sódio por mol de hexose anidra em função do tempo em que foram determinados, obteve-se uma curva de oxidação, onde o valor real do grau de oxidação do polímero foi obtida por extrapolação da inclinação da curva ao tempo zero.

2.6.3. PRODUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO

O ácido fórmico liberado no processo oxidativo, foi determinado pela titulação de uma alíquota (2ml), com hidróxido de sódio 0,01N, sob atmosfera de nitrogênio de acordo com o processo descrito por BAKER & SOMERS⁹, utilizando-se a seguinte fórmula, para o cálculo do teor de ácido fórmico liberado por mol de hexose anidra:

$$P = \frac{(A-B) \times V_t \text{ da solução oxidante} \times M'' \times PM}{\text{alíquota titulada (ml)} \times \text{amostra (mg)} \times 1000}$$

onde:

A = volume de hidróxido de sódio gasto para a titulação de alíquotas da solução oxidante que continha a amostra, após término da reação.

B = volume de hidróxido de sódio gasto para a titulação de alíquotas do branco.

M'' = molaridade da solução de hidróxido de sódio padronizada.

PM = aproximação do peso molecular médio das hexoses do polissacarídeo, calculado em função da sua composição química percentual.

P = produção de ácido fórmico por mol de açúcar anidro.

2.6.4. DEGRADAÇÃO DE SMITH DA FRAÇÃO F-075.

Uma amostra dos polialcoois obtidos, (item 2.6.1.), foram submetidos à hidrólise com ácido trifluoracético (1M por 4h à 100°), reduzidos com boridreto de sódio e analisados por c.f.g. na forma de acetatos de alditois, (coluna I; temperatura programada de 150-230°, 15 minutos à temperatura inicial, 3° por minuto).

2.7. CROMATOGRAFIA EM BIO-GEL DA FUCANA F-075.

Amostras de fucana F-075 foram submetidas à filtração em gel, utilizando peneiras moleculares de Bio-Gel, (Bio-Rad), com limites de exclusão de: a) P-100 (1,1mg, coluna de 1 X 68cm

de d.i.; fluxo médio 7 ml/h) utilizando solução de NaCl 1M como eluente; b) P-200 (2,25mg; coluna 1 x 68cm de d.i.; fluxo médio de 6ml/h), utilizando solução de NaCl 1M como eluente e c) P-200, (4,0mg; coluna de 1 X 70cm de d.i.; fluxo médio de 2,5ml/hora) utilizando uréia 7M como eluente.

O volume morto, (V_0), destas colunas cromatográficas foi determinado pela aplicação de azul de dextrana; e o volume interno, (V_i), com cloreto de cobalto, em experimentos paralelos. A coluna "C" foi utilizada para a cromatografia de dextrana (sigma), de PM 77.800 (3,2mg/0,2ml de uréia 7M).

2.8. DESSULFATAÇÃO DA FUCANA F-075.

2.8.1. TRATAMENTO ALCALINO (NaOH/NaBH₄).

O tratamento alcalino foi realizado de acordo com o processo descrito por PERCIVAL & WOLD⁹⁷. Fucana F-075, (60mg), foi dissolvida em água (10ml), acrescentado boridreto de sódio (80mg) e mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 48 horas. Hidróxido de sódio (400mg) e mais uma porção de boridreto de sódio (60mg), foram acrescentados, e a reação foi mantida à 82° por 48 horas. Ao final deste período, boridreto de sódio, (60mg), foi novamente acrescentado e a reação prosseguiu por mais 10 horas. O excesso de boridreto de sódio foi destruído pela adição de ácido acético 2M (até pH ~ 6), e a solução foi dialisada contra água deionizada (4 x 1 litro). A fucana após tratamento alcalino (F-OH) foi liofilizada (50,7mg, 84,5% de

rendimento). Foi determinado o conteúdo de sulfato, carboidrato total, proteína, ácido urônico e 3,6 anidro-galactose (utilizando padrão autêntico de 3,6 anidro-galactose). Uma amostra (4mg), foi hidrolisada (T.F.A. 1N por 3 horas à 100°), e analisada por c.f.g. na forma de acetatos de alditóis (coluna IV).

2.8.1.1. TRATAMENTO COM METÓXIDO DE SÓDIO.

A fucana F-OH (17,1mg), foi seca em aparelho de Abderhalden, (contendo pentóxido de fósforo) à 65° sob pressão reduzida. A fucana, foi então tratada com metanol, (8ml), (isento de água por destilação apropriada); sob agitação magnética por 3 dias. O sobrenadante foi removido com auxílio de seringa e acrescentado ao resíduo boridreto de sódio (3,4mg) e metóxido de sódio (4,2ml), sob refluxo por 24 horas. Após centrifugação o material insolúvel foi lavado com metanol (3 X 10 ml), e seco. Uma amostra (6mg), foi hidrolisada e analisada por c.f.g. na forma de acetatos de alditóis (coluna IV).

2.8.2. TRATAMENTO COM METANOL-HCl DA FUCANA F-075.

Uma amostra (110mg), da fucana F-075 foi tratada com solução de metanol-HCl 0,1M (por 50 horas), à temperatura ambiente, sob agitação magnética. Após centrifugação o material insolúvel foi lavado com metanol (5 X 10ml) e dialisado contra água destilada e liofilizado (35,6g; 36% de rendimento).

Determinações analíticas de grupo sulfato carboidrato total e por c.f.g. (acetatos de alditóis, coluna IV), foram

realizadas pelos processos convencionais anteriormente assinalados.

Determinação da viscosidade (21^o, viscosímetro Cannon Fenske) (μ red) foi realizada com a fucana antes e após este tratamento, pelo uso das seguintes fórmulas:

$$\mu \text{ red} = \frac{1}{C} \times \frac{\mu}{\mu_0} \quad \text{onde,}$$

μ = tempo de escoamento da amostra

μ_0 = tempo de escoamento da água

C = concentração da amostra, (g%).

Paralelamente uma amostra da F-075 foi tratada com metanol-HCl, (0,075M por 48 horas), nas mesmas condições descritas anteriormente.

2.8.3. TRATAMENTO SOLVOLÍTICOS.

2.8.3.1. PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO.^{117,123}

Uma amostra (200mg/20ml de água), da fucana F-075 foi tratada com boridreto de sódio, (12 horas à temperatura ambiente). Após acidificação do meio, (ácido acético até pH ~6), foi adicionado um excesso de resina dowex 50 x 8, forma H⁺, com a finalidade de transformar os grupos sulfato na forma ácida (SO₄⁻). Após filtração e diálise, o volume foi completado para 70ml pelo acréscimo de água e adicionado piridina (16ml; ~ 20%). A reação permaneceu

temperatura ambiente. Após diálise e liofilização, (192mg; 95% de rendimento) foi realizado tratamento com D.M.S.O.

2.8.3.2. TRATAMENTO COM D.M.S.O.

A fucana (sal de piridônio) foi tratada com DMSO na proporção de 200mg de polissacarídeo: 28ml de D.M.S.O.: 0,5ml de piridina segundo processo descrito por USOV *et al.*¹²³ O processo foi realizado à temperatura, (80° e 100°) e tempo, (2,4,6,10 horas), variáveis. Após tempo de solvólise adequado, diálise e liofilização, o rendimento variou em torno de 80-90%. Estes tratamentos não conduziam à uma dessulfatação do polímero, mesmo quando foram realizadas modificações do meio de reação (adição de metanol ou água), de acordo com os métodos descritos por INOVE & NAGASAWA⁵⁰ e NAGASAWA *et al.*⁷⁹. Análise por c.f.g., (acetato de alditól) e determinação do teor de grupo sulfato, foram iguais aos do polímero original.

2.9. DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DA FUCOSE NA FUCANA F-075.

A determinação da configuração absoluta da fucose presente na fucana F-075 foi realizada de acordo com o método descrito por LEONTEIN *et al.*⁵⁹.

Uma amostra da fucana F-075 (3mg), foi hidrolisada (T.F.A. 1N por 3 horas à 100°). Após remoção do ácido por sucessivas co-destilações com água, os produtos de hidrólise

foram transferidos para uma ampola de vidro e adicionado (-) 2-octanol, (0,5ml) e duas gotas de ácido trifluoracético, como catalizador. A ampola foi fechada (bico de Bunsen) e aquecida à 130° em banho de óleo por 15 horas, sob agitação magnética. A solução foi concentrada a pressão reduzida e os glicosídeos resultantes foram acetilados (piridina-anidrido acético, 1:1 v/v) à temperatura ambiente por 70 horas, seguido de aquecimento à 100° por 5 minutos. O excesso de reagentes foi removido por co-destilação com etanol (5 x 10ml).

Fucose, (Sigma), D e L (4mg) foram derivatizadas com (-)-2-octanol, (1ml), como descrito anteriormente para a fucana F-075.

As análises de c.f.g., na forma de octil-glicosídeos acetilados foram realizadas à temperatura de 190°, (coluna I), e o tempo de retenção relacionado ao 1,5-di-D-acetil-2,3,4,6-tetra-D-metil-D-glucitol.

2.10. CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO GLUCURÔNICO NA FUCANA F-075.

Com a finalidade de identificar se o aumento percentual de glucose, na fucana após carboxi-redução, era originado de unidades de ácido glucurônico ou ácido gulurônico foi realizado o seguinte experimento:

A)Fucana F-075 e F-075-EDC, foram separadamente hidrolísadas (5mg), com TFA.(1N por 3h à 100°). O ácido foi removido por sucessivas co-destilações com água, à pressão

reduzida. Os produtos de hidrólise foram diretamente acetilados (piridina-anidrido acético, 1:1 v/v) por 40 horas à temperatura ambiente.

O excesso ,de reagentes foi removido por sucessivas co-destilações com tolueno (5 x 5 ml).

B) Paralelamente foram conduzidos experimentos com: 1) α -gulose tratada com T.F.A. (1M por 3 h à 100°), e acetilada ; 2) α -gulose tratada com T.F.A. (1M por 8h à 100°) reduzida, (NaBH_4), e acetilada; 3) fucose tratada com NaBH_4 e acetilada; 4) α -fucose acetilada.

Os tempos de retenção, (T), foram referidos a 1,5-di- α -acetil-2,3,4,6-tetra- β -metil glucitol, (c.f.g., coluna I).

2.11. METILAÇÃO DA FUCANA

A metilação da fucana foi realizada por dois métodos distintos:

1. MÉTODO DE HAKOMORI⁴⁷: Fucana F-075 foi solubilizada em água e as extremidades redutoras reduzidas com um excesso de boridreto de sódio. Após acidificação do meio, (pH 4 - 5), diálise e liofilização a fucana foi seca em aparelho de Abderhalden (por 4h à 65°). A fucana F-075 (86,2 mg), com as pontas protegidas por redução; foi solubilizada em D.M.S.O., (8 ml) e mantida à 60°, até completa solubilização, (2h), do polissacarídeo. Após esfriamento da solução, foi adicionado metil sulfinil anion, (0,25 ml= $0,95 \times 10^{-3}$ equivalentes) e a reação prosseguiu por 7

horas sob agitação magnética à temperatura ambiente. Iodeto de metil, (0,1 ml), foi adicionado aos poucos de modo que a temperatura não fosse superior à 25°, e a reação foi mantida por mais 12 h, quando foi novamente adicionada outra porção (0,05 ml) da base. Após agitação (12h) o polissacarídeo dialisado, foi submetido à extração com clorofórmio, (3 X 10 ml, sob agitação magnética). Análise por I.V. demonstrou a ausência de absorção na região de grupos hidroxilicos.

A metilação da fucana carboxi-reduzida foi conduzida de maneira semelhante à discutida anteriormente.

2. MÉTODO DE HAWORTH⁴⁸: As fucanas F-075 (33,3 mg) e F-075-EDC (30 mg), previamente tratadas com boridreto de sódio, foram solubilizadas em água (1ml). A esta solução foi acrescentado sulfato de dimetila (1,3 ml) e NaOH à 40%, (2,6 ml), gota a gota, durante um período de 3 horas, sob agitação magnética e a temperatura de 20°. Após 20 horas de reação, o meio foi neutralizado e o polissacarídeo dialisado e liofilizado. Este processo foi repetido por mais 4 vezes. Fucana F-075 (15 mg), e F-075-EDC (17 mg), correspondendo à um rendimento de ~73%.

2.11.1. HIDRÓLISE DA FUCANA METILADA

O processo de hidrólise da fucana metilada (F-075, F-075-EDC), foi conduzida de acordo com GARREG & LINDBERG²⁴.

A 8,6 mg do polissacarídeo metilado foi acrescentado ácido sulfúrico à 72%, (66 ml), à temperatura de 0-5°. A suspensão foi mantida sob agitação magnética constante até

solubilização (1 hora). A concentração da solução foi ajustada à 8% (0,53 ml de água), e a hidrólise prosseguiu por 4h à 100°. Após esfriamento e extração com clorofórmio, a fase aquosa foi neutralizada com carbonato de bário, (até pH=7). O sulfato de bário resultante foi tratado com etanol (4 X 10 ml), sob agitação magnética, para recuperação de mono-, dimetil ou açúcar livre.

O extrato clorofórmio, (lavado com água 3 X 10 ml), foi evaporado à temperatura ambiente, reduzido com NaBH₄, (pH 8-9). Após neutralização, tratamento com resina (dowex 50 X 8, forma H⁺), o material filtrado e liofilizado foi co-destilado com metanol, (3 X 5ml), e acetilado.

Análise por c.f.g. foi conduzida à 170°, (coluna II) e 190°, (coluna I).

2.12. HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA

A hidrólise ácida parcial da fucana, foi realizada segundo o método descrito por ANNO *et al.*⁴. A fração F.P., (1,29g), foi solubilizada em solução de ácido sulfúrico 0,05 M, (100 ml), e neutralizada (Ba(OH)₂ até pH=6). Após centrifugação foi adicionado etanol (3v), com a finalidade de precipitar a fucana parcialmente degradada (=FD). A F.D. foi tratada com dowex 50 X 8 (forma H⁺), filtrada e neutralizada com solução de hidróxido de potássio até pH=7, FD-1 (~250 mg). O sobrenadante etanólico foi concentrado à pressão reduzida, solubilizado em água destilada, (5ml), e percolado através de uma coluna contendo dowex 50 X 8 (2 X 30 cm), para remoção do bário. O eluato foi

neutralizado com uma solução de hidróxido de potássio até pH=7. Esta fração foi aplicada à uma coluna, (1 X 30 cm), contendo dowex 1 X 8 (200-400 mesh, forma formiato). Eluição foi realizada com: a) água destilada (1,5 litros), afim de separar os componentes neutros (F.N., 330 mg), e a seguir com b) solução de ácido fórmico a 20% (v/v; 2 litros), para a obtenção da fração ácida. O ácido fórmico foi co-destilado com água, à pressão reduzida, (40°) e a fração obtida liofilizada, (=FA, 350 mg).

Uma amostra da fucana F-075, (0,93 g), foi submetida à hidrólise ácida parcial como descrito para a fucana F.P., obtendo-se a fração degradada FD-2.

2.12.1. CARBOXI REDUÇÃO DA FRAÇÃO FD.

Devido à presença de ácidos urônicos na fucana FD-1, uma amostra, (~123 mg), foi carboxi-reduzida¹¹⁹ em meio tamponado¹¹⁶, utilizando-se derivado de carbodiimida, (E.D.C., 300mg) e NaBH_4 , (2g), de maneira semelhante à descrita no item 2.5. O processo de carboxi-redução foi repetido por mais uma vez, (FD-2XEDC, 110mg, 86% de rendimento).

Uma amostra desta fração foi hidrolizada, (T.F.A., 1M por 5h à 100°), e analisada por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis (coluna I).

2.12.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FD-2XEDC E FD-2, EM COLUNA DE BIO-GEL.

A fração FD-2xEDC, (110 mg), foi submetida à fracionamento em coluna de Bio-Gel P-30, (1,8 x 65 cm de d.i.), utilizando cloreto de sódio como eluente, (fluxo médio de 10 ml/h). As alíquotas, (2,5 ml), foram analisadas para carboidrato total. O volume V_0 e V_i foram determinados como descrito no item 2.7. A fração majoritária, (FD-I-EDC; 50 mg) e a minoritária, heterogênea, (FD-II-EDC; 27 mg), foram hidrolisadas, (T.F.A., 1N por 5 h à 100°) e analisadas por c.f.g. (acetato de alditol, coluna I).

A fração FD-2 foi fracionada de maneira semelhante, obtendo-se duas frações: FD-A, (majoritária, 32 mg) e FD-B, (heterogênea, 16,5 mg).

A fração FD-A (32 mg) foi carboxi-reduzida, (2x), como descrito no item 2.12.1, (FD-A-2xEDC, 31 mg), e analisada por c.f.g. (alditol acetato, coluna I).

2.12.3. METILAÇÃO DA FRAÇÃO FD-I-EDC E FD-A-2xEDC

Amostras da FD-I-EDC e FA-2xA-EDC, (10 mg), previamente tratadas com NaBH_4 , foram solubilizadas em DMSO, (1 ml), e metiladas pelo método de HAKOMORI⁴⁷ como descrito para a fucana F-075, item 2.11. O processo de metilação foi repetido por mais uma vez, e correspondentes polissacarídeos metilados foram hidrolisados pelo método descrito por GARREG & LINDBERG²⁴ (item 2.11.1). Análise por c.f.g. foi realizada à 170°, (coluna IV) e

190°, (coluna II) na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilado.

2.12.4. DEGRADAÇÃO DE SMITH DA FRAÇÃO FD-A-2xEDC

Uma amostra dos polialcoois da fração FD-A-2xEDC, (150h de oxidação com periodato de sódio 0,025 M) foi hidrolisada, (T.F.A. 1N por 5h à 100°) e analisada por c.f.g., (alditol acetato, coluna I e II à 190° e 170° respectivamente).

2.12.5. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FA EM COLUNA DE CELULOSE

A fração FA, (350 mg), obtida por hidrólise ácida parcial da fucana (item 2.12) apresentava dois componentes por c.p. (solvente "b"; revelador I; II; R_{glc} 0,82 e 0,55) e por eletroforese (tampão IV, revelador I, II). Esta fração foi purificada em coluna de celulose, (50 x 2,1 cm de d.i.), utilizando como eluente solução de acetona-água na proporção de: 9:1, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, (600 - 800 ml de cada eluente), e finalmente com água, (100 ml). As respectivas frações foram concentradas, (pressão reduzida, 40°) e submetidas à c.p. e eletroforese, (condições iguais à anterior). O componente com R_{glc} 0,82 foi obtido puro na fração eluída com acetona-água 8:1, (FA-1), na qual foi determinado teor de grupo sulfato, carboidrato total e redutor. Análise por c.f.g. (alditol acetato, coluna I), revelou a presença de fucose como único componente.

Análise de I.V. foi realizada na forma de pastilha, (KBr). As frações eluídas com acetona-água, 6:1 e 4:1

apresentavam os dois componentes anteriormente relatados em igual proporção, (eletroforese e c.p.) e não foram submetidos a nova purificação.

2.12.6. METILAÇÃO E OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO DA FRAÇÃO FA-I

A oxidação com *meta*-periodato de sódio da fração FA-I, foi realizada como descrita para a fucana F-075 no item 2.6.1.

A fração FA-I, constituída de fucose 4-sulfato, foi metilada pelo método de HAKOMORI⁴⁷.

Uma amostra, (7,25 mg), desta fração foi dissolvida em DMSO, (1 ml), sob atmosfera de nitrogênio, em tubo de vidro fechado com rolha de borracha. A esta solução foi acrescentado solução de metilsulfinilcarbânio, (57 μ l), sob agitação magnética. Após 7 horas de reação, foi acrescentado iodeto de metila, (13 μ l), mantendo-se a temperatura abaixo de 20°. Após 3h, uma segunda porção (13 μ l) de base foi adicionada, e a reação proseguiu por mais 12 horas sob agitação magnética. A esta solução foi acrescentado H₂SO₄ 0,5M, (1 ml) e mantida à 100° por 2 horas. Nestas condições foram removidos: a) grupos sulfato, tornando o monossacarídeo metilado susceptível, (solúvel), à extração com clorofórmio; b) grupo metil glicosídico.

A fase clorofórmica foi lavada com água (5 x 10 ml), e evaporada à temperatura ambiente. O produto metilado foi reduzido com NaBH₄, (pH 8-9), e acetilado, (c.f.g.; coluna I e coluna II).

2.13. CARBOXI-REDUÇÃO DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis.

O ácido algínico de L. brasiliensis, foi carboxi-reduzido por dois processos distintos, para a obtenção do correspondente polímero na forma neutra.

A - Tratamento com derivado de carbodiimida/ NaBH_4 ; (TAYLOR & CONRAD).¹¹⁹

A carboxi-redução do ácido algínico de L. brasiliensis foi realizada segundo processo de TAYLOR & CONRAD¹¹⁹, sendo o meio de reação tamponado como sugerido por STONE & ANDERSON¹¹⁶.

Alginato de sódio, (1 g), foi solubilizado em 200 ml de tampão M.E.S., 0,2 M; pH=4,75. Derivado de carbodiimida, (E.D.C.; 3 g), foi adicionado em pequenas porções, (~0,2 g), por um período de 1 hora. A reação permaneceu por mais 1 hora, sob agitação magnética à temperatura de 30°. Para a realização da redução do ester formado, na etapa anterior o pH do meio foi previamente ajustado à 7, pela adição de tampão T.E.S. 2M. Pequenas porções de NaBH_4 foram adicionadas, de cada vez, sob agitação magnética, de modo a obter uma solução 2M. A solução permaneceu por 2h à 50°. O excesso de boridreto foi destruído pela adição de ácido acético (até pH 6-6,5, à 0°) e a solução resultante foi dialisada. Este processo foi repetido por mais uma vez, para a obtenção da correspondente gulomanana neutra, (0,9 g, 90% de rendimento). A determinação da relação molar de ácido β -D-manurônico e α -L-gulurônico, (relação M/G), foi obtida por: a) análise por c.f.g (acetato de alditol, coluna IV, onde: M/G =

manitol hexa- β -acetato / gulitol hexa- β -acetato+1,6 anidro β -L-tri- β -acetil-gulose; b) análise de r.m.n.- ^{13}C ., (item 1.6, aparelho "A").

B - Tratamento com óxido de propileno/ NaBH_4

Ácido algínico, (2 g), foi suspenso em água, (316 ml) e adicionado óxido de propileno, (28,4 ml), sob agitação magnética, em sistema fechado, à temperatura ambiente, de acordo com o processo descrito por DEUEL¹⁹. A reação de esterificação do ácido algínico prosseguiu até o pH do meio atingir a neutralidade, (pH inicial= 5,5; após 186 horas de reação, pH 7).

O ester de alginato-propileno foi precipitado pela adição de acetona, centrifugado e o precipitado obtido foi solubilizado em água e liofilizado, (rendimento, 2 g).

A etapa de redução do ester foi realizada segundo ASPINALL & CANAS-RODRIGUES⁷ e para tal fim utilizou-se a seguinte proporção: 1g de ester, 0,32g NaBH_4 e 0,41g de glicerol. A adição do glicerol tem a função de manter o pH~8, e minimizar a destruição do ester formado durante a etapa de redução. A adição de NaBH_4 foi realizada à 0 $^{\circ}$, sendo a reação mantida nesta temperatura por mais 12h. O excesso de boridreto foi destruído pela acidificação do meio, (pH 6), e o polissacarídeo recuperado, (1,73 g, 86,5 % de rendimento), foi dialisado e liofilizado.

O processo de esterificação e redução foi realizado por mais duas vezes. As frações obtidas foram denominadas de: A-1-OP, A-2-OP e A-3-OP, conforme tenham sido obtidas após o primeiro,

segundo, (1,2 g, 60 % de rendimento) e terceiro (1,0 g, 50 % de rendimento), tratamentos com óxido de propileno/ NaBH₄.

O acompanhamento destes sucessivos tratamentos do ácido algínico foi realizado pelas determinações de: a) relação molar de M/G por c.f.g. (alditol acetato, coluna I); b) poder rotatório; c) viscosidade reduzida, como descrito no item 2.82.

A percentagem de ácido urônico no polímero carboxi-reduzido (processo "A" e "B") foi determinado por: dosagem de ácido urônico, (carbazol), e titulação reversa, (item 2.13.1)

2.13.1. DETERMINAÇÃO DO EQUIVALENTE-GRAMA DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis.

Para a determinação, do equivalente grama do ácido algínico de L. brasiliensis, este foi primeiramente tratado com uma solução de HCl, (0,2 M por 15h), sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após diálise, (água deionizada) e liofilização o polissacarídeo foi seco, (105° por 4h).

O equivalente-grama foi determinado por titulação reversa em atmosfera de nitrogênio: o polissacarídeo, (19,43 mg), foi solubilizado em solução de NaOH 0,01 M padronizada, (9,20 ml), e titulado com solução de HCl 0,01 M padronizada, utilizando fenolftaleína como indicador. O equivalente de neutralização foi calculado, segundo a seguinte expressão:

$$Eq = \frac{P \times 1000}{(V - V') \times M} \quad \text{onde,}$$

P = gramas da amostra, expresso em peso seco.

M = molaridade da solução de ácido clorídrico padronizada.

V = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da solução polissacarídica

V' = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco.

Eq = equivalente-grama

2.13.2. HIDRÓLISE DO ÁCIDO ALGÍNICO

O ácido algínico, (100 mg, expressos em termos de carboidrato total, tomando-se como referência ácido glucurônico), foi hidrolisado com T.F.A.. Utilizou-se diferentes concentrações de ácido, (0,25; 0,50; 1,0; 2,0 M), por diferentes intervalos de tempo, (2, 4, 6, 8, 20, 27,5 h), à 100°, em ampola de vidro fechada.

Nestas condições, o melhor rendimento de hidrólise foi com T.F.A. 0,5 M por 20h, obtendo-se na fração solúvel, (obtidas por centrifugação), apenas 25% do açúcar total, contendo ácido urônico, (18 %) e açúcar redutor (17,1 %).

Um melhor rendimento de hidrólise foi obtido por uma modificação do processo anterior, usando uma maior concentração de ácido (72 % à 2 - 4°, por 18h), seguido de diluição do ácido para 0,25 M (por 20h à 100°). Com esta modificação obteve-se 40% de hidrólise, expresso em termos de açúcar total.

2.13.3. METILAÇÃO DA FRAÇÃO A-EDC

A fração de alginato, A-EDC, carboxi-reduzida por tratamento com carbodiimida/ NaBH_4 , foi metilada sequencialmente pelo método de HAWORTH⁴⁶ e HAKOMORI⁴⁷.

A - Método de HAWORTH⁴⁶: A fração, A-EDC, (103,5 mg), foi suspensa em água, (3 ml) e tratada com um excesso de boridreto de sódio, (por 12 h à temperatura ambiente). A esta solução foi acrescentado NaOH a 30%, (6 ml) e sulfato de dimetila, (3 ml), os quais foram acrescentados gota a gota por um período de 5 h. A metilação proseguiu como descrito no item 2.11. Após repetição deste processo (98 mg), a solubilização do polissacarídeo em DMSO foi satisfatória.

B - Método de HAKOMORI⁴⁷: O polissacarídeo parcialmente metilado foi solubilizado em DMSO, (2 ml) e adicionado metil sulfonil anion, (1N, 0,85 ml). A metilação proseguiu como descrito para a fucana de F-075, item 2.11, (rendimento de 90 mg).

O polissacarídeo foi hidrolisado pelo processo descrito por GARREG & LINDBERG²⁴, detalhada no item 2.11.1. Análise por c.f.g., foi realizada na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados, (coluna I e II).

2.13.4. SEPARAÇÃO DO ÁCIDO MANURÔNICO E GULURÔNICO POR COMPLEXAÇÃO COM BRUCINA

Foi realizada uma tentativa de separação de ácido α -L-gulurônico e β -D-manurônico do ácido algínico de L. brasiliensis,

utilizando brucina segundo o método descrito por SIDDIQUI¹⁰⁹.

Ácido algínico foi hidrolisado com ácido sulfúrico à 72 %, (100 ml, por 17 h à 5°). A concentração do ácido foi ajustada à 1M (6h à 100°). O hidrolisado foi neutralizado, (BaCO₃), filtrado e concentrado à secura (pressão reduzida à 40°). Os sais de bário foram dissolvidos em água, (40 ml) e tratados com resina catiônica, (dowex 50 x 8, forma H⁺) e ao filtrado foi adicionado brucina, (5g, 100° por 20 min). Após esfriamento a solução foi tratada com clorofórmio, (3 x 50 ml) para remoção do excesso de brucina. A fase aquosa foi parcialmente concentrada, (10 ml) e adicionado um excesso de acetona, (250 ml). O precipitado obtido por centrifugação, (α -guluronato de brucina) foi lavado sucessivamente com água-acetona, (1:4), acetona, e seco à temperatura ambiente. No sobrenadante, após repouso, (12h à 0°), foi recuperado o manuronato de brucina, o qual, foi tratado com acetona-água, como descrito anteriormente.

Após remoção da brucina, (dowex 50 x 8, forma H⁺) e liofilização, o ácido α - α -gulurônico (70 mg) e ácido β - β -manurônico, (270 mg), foram cromatografados (solvente d, visualizador I). A presença de componentes com R_{glcA} de 1,28; 0,92 e de 1,28; 0,64; 0,47 nas correspondentes frações de manurônico e gulurônico, respectivamente, demonstra a não seletividade do fracionamento, quando aplicado ao ácido algínico de L. brasiliensis.

A relação M/G, (por peso), foi de 4:1; valor superestimado em virtude da degradação do ácido gulurônico,

durante o processo hidrolítico.³³

2.13.5. HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis

A hidrólise ácida parcial do ácido algínico de L. brasiliensis foi realizada segundo processo de HAUG *et al.*³⁸. Alginato de sódio purificado por tratamento com cetavlon (1,96 g em p.s.), foi solubilizado em água (30 ml), e a esta solução foi acrescentado ácido oxálico 2 M, (30 ml). A suspensão foi mantida por 20 h em banho maria sob atmosfera de nitrogênio. Após esfriamento a solução foi centrifugada, (16.000 g por 25 min.), e o precipitado recuperado após centrifugação foi suspenso em água, (2x) e centrifugado. O precipitado obtido após este tratamento foi suspenso em água, (30 ml) e neutralizado até pH=7, (NaOH 1N). Esta solução foi novamente submetida à hidrólise, nas mesmas condições anteriores.

Os sobrenadantes ácidos obtidos, após centrifugação foram reunidos e denominados de fração S-1, a qual após neutralização à pH=7 e tratamento com resina catiônica (dowex 50x8, forma H⁺), forneceu 0,84g (=FH).

O resíduo obtido, após hidrólise com ácido oxálico, (1M por 20h à 100°, por 2 vezes), foi denominado de fração resistente, (FR). Esta fração foi lavada com água, neutralizada, (NaOH 0,1M até pH=7) e dialisada, (NaCl 0,1M).

A fração resistente à hidrólise, F.R., (0,79 g), foi fracionada à pH 2,85 pelo acréscimo de HCl 0,01M. Uma fração

solúvel, (S-2), correspondendo a "blocos" de ácido, β -D-manurônico, e outra insolúvel, (R-2, "blocos" de ácido α -L-gulurônico) foram obtidas após centrifugação, (20.000 g por 20 min.). Estas sub-frações foram dialisadas, ("cutoff" 3500) fornecendo 0,15 e 0,45 g respectivamente. Após tratamento subsequente das frações S-2 e R-2 com cetavlon (pH=7) foram obtidas as respectivas frações FS (0,12 g) e FI (0,34 g).

2.13.6. REDUÇÃO DOS GRUPOS CARBOXÍLICOS DAS FRAÇÕES FS E FI, OBTIDAS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis.

Para facilitar a determinação da composição química dos "blocos" de ácido β -D-manurônico e α -L-gulurônico foi realizada a carboxi-redução destas frações por dois métodos distintos:

A - Carboxi-redução com carbodiimida/ NaBH_4 ^{119,116}

A FS, (294 mg) e a FI, (267 mg), foram, separadamente solubilizadas em tampão M.E.S. (0,2 M, pH 4,75) e adicionado C.M.C., na proporção de 2 milimoles de C.P.C.: 50 moles de ácido urônico. A etapa de esterificação e redução do ester formado foi realizada como descrito para a carboxi-redução do ácido algínico, item 2.13.

Os correspondentes fragmentos neutros, assim obtidos, ("blocos" de β -D-manose, (FS-CMC) 65% de rendimento e "blocos" de α -L-gulose, (FI-CMC) 60% de rendimento), foram hidrolisados (T. F.A., 1N por 8h à 100°), e analisados por c.f.g., (acetato de alditóis, coluna I).

B - Carboxi-redução com óxido de propileno/ NaBH_4 ^{7,19}

As frações FS (300 mg) e FI, (300 mg) foram previamente tratadas com solução de ácido clorídrico à pH=2, e dialisadas (até pH 5). Estas frações foram esterificadas com óxido de propileno, (FI 4ml/44ml de água e FS, 5ml/55ml) de água). O processo de este-rificação e redução foi conduzido como descrito no item 2.13. As frações FS-CMC, FI-CMC (carboxi reduzidas como no item A) e as frações FS-OP, FI-OP (item B), foram hidrolisadas, (TFA 1N por 8h à 100°), e analisadas por c.f.g., (alditol acetato, coluna I), para a determinação de sua composição química, bem como para determinar o grau de pureza.

O grau de carboxi-redução destas frações foi determinado por titulação reversa (item 2.13.1) e dosagem de ácido urônico, (carbazol).¹²

2.13.7. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO F-H, EM COLUNA DE CELULOSE

A fração F-H, (hidrolisável), obtida por hidrólise ácida parcial do ácido alginico de L. brasiliensis, foi previamente neutralizada com CaCO_3 (até pH=7), filtrada e o resíduo, (oxalato de cálcio), desprezado. Esta fração, foi aplicada à uma coluna (2,5 x 50), contendo resina trocadora de anions, (dowex 1 x 8, forma acetato). A eluição foi promovida com: a) água (3 litros), eluato isento de carboidratos e b) solução de ácido acético-ácido fórmico, pH ~1,5, (2 litros). Esta fração era composta de uma mistura de ácidos urônicos e foi fracionada em coluna de celulose.

A fração F-H, (0,30 g), foi aplicada em coluna (3 x 60 cm de d.i.), contendo celulose. A montagem, preparação e aplicação da amostra foi realizada de acordo com GARDELL²⁵, WHISTLER & BEMILLER¹²⁵. A eluição foi realizada com: a) acetona, (350 ml); b) soluções de acetona-água, (v/v) nas proporções de 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1 e finalmente com água, (~1 litro de cada eluente).

As frações eluídas com acetona-água na proporção de 2:1 e 4:1 apresentavam quatro, ($R_{glcA} = 0,51; 0,78; 0,95; 1,05$) e dois: ($R_{glcA} = 0,51; 0,78$) componentes respectivamente, quando submetidas à eletroforese em tampão contendo cálcio³² (tampão IV, revelador I).

Eletroforese, (tampão III e visualizador I e II) e c.p. (solvente c, d; visualizador I, II) demonstraram, apenas, a presença de tres componentes nas fração eluída com acetona:água 2:1 e um componente na fração eluída com acetona:água 4:1.

2.13.8. TRATAMENTO ACIDO DA L-GULOSE

A) L-gulose, (sigma, 3,5 mg) foi solubilizada em água (0,7 ml) e tratada com T.F.A. (2N, 0,7 ml por 8h à 100°). O excesso de ácido foi destruído por sucessivas co-destilações com água, (pressão reduzida à 40°). A gulose residual e seu correspondente anidro-açúcar (1,6 anidro- β -L-gulose) foram tratados com NaBH_4 (3h à temperatura ambiente). O excesso de boridreto foi destruído (ácido acético até pH 5), e após dessalificação (dowex 50 x 8, forma H^+) o filtrado foi liofilizado. O ácido bórico foi removido, (co-destilação com metanol, 4 x 5 ml), e os açucares

foram acetilados, (piridina: anidrido acético 1:1) por 48h à temperatura ambiente, seguido de aquecimento à 80° por 5 min. O excesso de reagentes foi removido por co-destilação com tolueno (5 x 5 ml). Análise por c.f.g. (coluna I, à 205°) revelou a presença de três componentes com T de : 2,1 (1,6 anidro- β -L-tri-D-acetil-gulose); 6,88 (gulitol-hexa-D-acetato) e 7,32 (gulose hexa-D-acetato) relativos ao 1,5 di-D-acetil-2,3,4,6-tetra-D-metil-glucitol.

B) L-gulose, (2 mg/0,4ml de água), foi tratada com T.F.A. (1N, 3h à 100°). Após remoção do ácido, os açucares foram acetilados nas condições descritas em "A". Análise por c.f.g. (coluna I, à 205°) revelou a presença de dois componentes com T de 2,10 (1,6 anidro- β -L-tri-D-acetil gulose) e 7,32 (gulose hexa-D-acetato).

III - RESULTADOS E DISCUSSÕES

As algas pardas do gênero *Laminaria* são características de águas frias e temperadas do hemisfério Norte.

Em 1967, JOLY & OLIVEIRA⁵¹ descreveram duas espécies de *Laminaria*, *L. brasiliensis* e *L. abyssalis* as quais foram coletadas em zonas tipicamente tropical da costa nordeste do Brasil. Essas espécies, segundo OLIVEIRA & QUEGE⁸³ crescem sobre algas calcáreas (Melobesioideae) a uma profundidade de 40-120 metros.

Embora os bancos de crescimento¹⁰⁰ destas algas não estejam completamente delimitados, os levantamentos até o presente demonstram que estas *Laminarias* se distribuem em uma faixa ampla e aparentemente contínua, de largura variável e que se estende do norte do Estado do Espírito Santo (região de Cabo Frio) até o sul do Estado da Bahia (região de Abrolhos).

Nos países de clima frio, foi observado uma grande variação sazonal no teor de ácido algínico. De acordo com PERCIVAL & McDOWELL⁹⁶ o teor de manitol e laminarana em *Laminariales* (*L. hyperborea*, *L. digitata*, *L. saccharina*) aumenta nos meses de abril a setembro, enquanto que o teor de ácido algínico e celulose decresce neste período e aumenta de outubro a abril.

No presente trabalho não foi incluído nenhuma investigação sazonal de *L. brasiliensis* por dificuldade de coleta e de disponibilidade financeiras. Entretanto, em estudo não incluído no presente trabalho, foi verificado que para o

Sargassum cymosum, coletado no Paraná (Região de Caiobá - Brasil), a variação sazonal no teor de ácido algínico não foi tão acentuada (28 a 32 % durante doze meses de coleta).

A L. brasiliensis utilizada no presente trabalho foi cedida pela Bióloga Juliane Leite, sendo a coleta realizada no mês de abril de 1983, a uma profundidade de ~20 metros, no litoral do Estado do Espírito Santo, Brasil.

Utilizando-se processo apropriado de extração dois polissacarídeos ácidos de L. brasiliensis foram isolados: ácido algínico e heterofucanas sulfatadas.

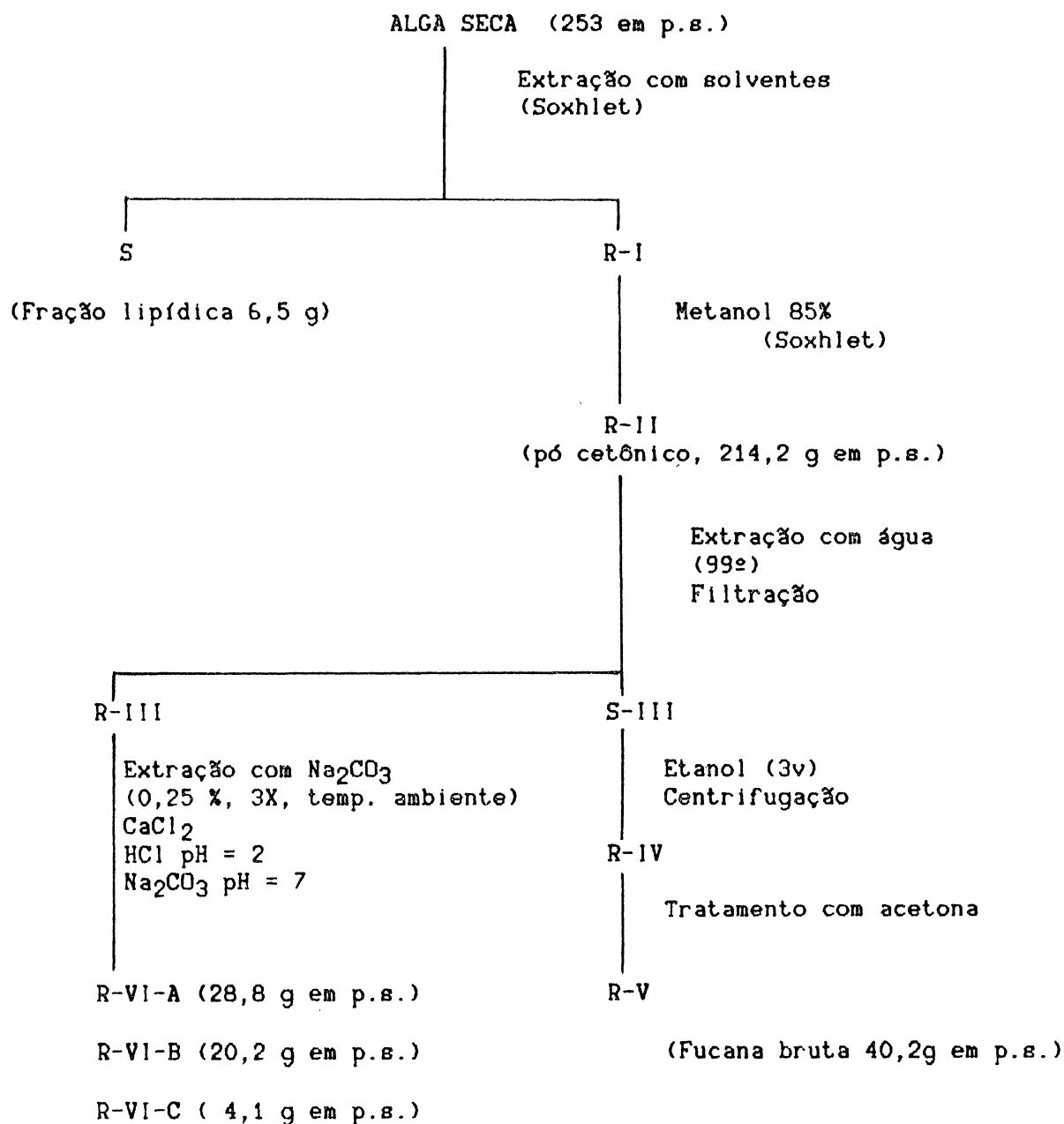
A glucana, laminarana, comumente encontrada em outras algas pardas, não foi investigada no presente estudo.

A alga seca e moída, (253 g em p.s.) foi previamente submetida a tratamento com solventes orgânicos (Esquema A), com a finalidade de remover lipídeos, (6,5 g) e pigmentos.

Para a extração do ácido algínico foram utilizados dois processos básicos, um visando apenas a extração deste poliurônido e outro utilizado para a extração sequencial dos polissacarídeos desta alga parda. A extração do ácido algínico foi realizado com solução diluída de carbonato de sódio, (0,25%, 3 vezes a temperatura ambiente). Em concentrações mais elevadas de carbonato de sódio (> 2%) observou-se um decréscimo do teor de alginato de 22,4 para 18,2 %.

A purificação final do ácido algínico envolve etapas de complexação com sal de cálcio e liberação do ácido algínico por tratamento com ácido clorídrico.

ESQUEMA A

EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE L. brasiliensis

S = Sobrenadante
R = Resíduo

O rendimento de ácido algínico de L. brasiliensis foi de 22,4 % (em p.s. relativo ao pó cetônico) quando utilizado o processo de extração anteriormente descrito. Este valor situa-se na faixa dos obtidos em diferentes espécies de algas pardas.

Em sargassanas⁷⁶ há variação de 4,5 a 34,6 %, 14% em Dictiopteris plagiogramma.⁹⁴

Em Laminareas, o teor de ácido algínico varia de 17-22% em L. saccharina 25-44 % em L. digitata, já em Fucales (F. spiralis, F. serratus, F. vesiculosus, F. ceranoides) este valor situa-se na faixa de 17-29%. Valores semelhantes 22-25% e de 22-30% foram também assinalados por REVIERS et al.¹⁰⁴ para Pelvetia canaliculata e Ascophillum nodosum, respectivamente.

O processo de extração sequencial é utilizado quando se pretende obter além do ácido algínico, outros polissacarídeos e compostos de baixo peso molecular.

As etapas do segundo processo de extração de polissacarídeos de L. brasiliensis, visam a obtenção sequenciada de ácido algínico e de heterofucanas sulfatadas. (Esquema A)

O resíduo delipidificado (R-I), foi tratado com metanol a 85%, obtendo-se uma fração rica em manitol, como único carboidrato de baixo peso molecular.

Após purificação apropriada, o manitol foi obtido em estado cristalino (7,6 % em p.s. relativo ao pó cetônico), com p.f. de 166 e com T (c.f.g. coluna IV) igual ao do manitol padrão.

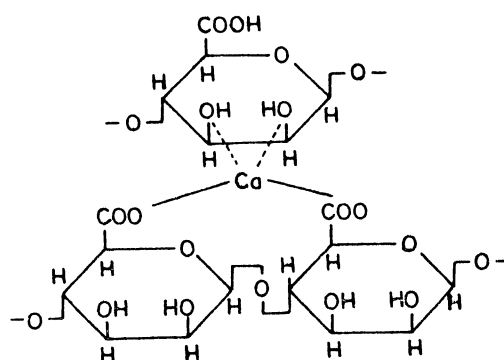
Do tratamento aquoso do pó cetônico, (214,2 em p.s.), foi obtido uma heterofucana bruta, (F.B., 18,7 % em p.s. relativo ao pó cetônico), impurificada com ácido algínico.

O ácido algínico (na forma de sal de sódio), foi extraído do resíduo aquoso, (R-III) utilizando-se solução de carbonato de sódio (3x 0,25% à temperatura ambiente). O rendimento de 24,8 % (em p.s. relativo ao pó cetônico) é semelhante ao obtido no primeiro processo (22,4 %).

A dificuldade de obtenção de ácido algínico livre de fucana foi ressaltada por MIAN & PERCIVAL⁷⁵ quando submeteram pó de alga a sucessivos tratamentos com cloreto de cálcio, ácido clorídrico pH=2, oxalato de amônio e tratamento com clorito. Todos extratos continham fucana, exceto aquele obtido por tratamento com ácido clorídrico.

Para contornar tal dificuldade recomenda-se a precipitação fracionada do alginato impuro com sal de cálcio. Por tratamento subsequente com ácido clorídrico diluído, ácido algínico, livre de cálcio é obtido com apreciável grau de pureza.

De acordo com SCHWEIGER¹⁰⁶, a precipitação de alginato com íons cálcio ocorre através de um complexo (I), envolvendo dois grupos carboxílicos de uma mesma cadeia polimérica com duas hidroxilas vicinais de outra cadeia. Após acetilação^{106,110}, o ácido algínico não forma tal complexo.



Estudos mais detalhados sobre coordenação de ácido algínico de L. brasiliensis com outros metais divalentes, estão sendo realizados⁶⁸.

O equivalente-grama do ácido algínico de L. brasiliensis foi determinado por titulação reversa do excesso de hidróxido de sódio com ácido clorídrico, após secagem do polissacarídeo à 105° por 4 horas. O valor de 216 encontrado, (expresso em termos de ácido algínico, peso seco), é compatível com uma unidade de uronosil associada à moléculas de água.

Embora, o valor teórico para cada unidade de urososil seja de 176, a presença de água fortemente associada eleva este valor para uma faixa mais alta, mesmo em alginato seco à 105° até peso constante.

PERCIVAL & McDOWELL⁹⁶ também encontraram um valor de 216 em alginato seco a 105° por 4 h. Para o ácido algínico de L. hyperborea, Fucus vesiculosus e Azotobacter vinelandii o equivalente-grama foi de 220, 200 e 230, respectivamente.

Segundo McNEELY & PETTIT⁷⁰, a remoção da água de hidratação destes poliurônídeos, utilizando condições drásticas de secagem, ocasiona degradação do polímero, podendo fornecer valor de equivalente-grama que falsamente se aproxima do teórico.

As etapas envolvidas na purificação da fucana bruta, (FB), de L. brasiliensis estão no Esquema B.

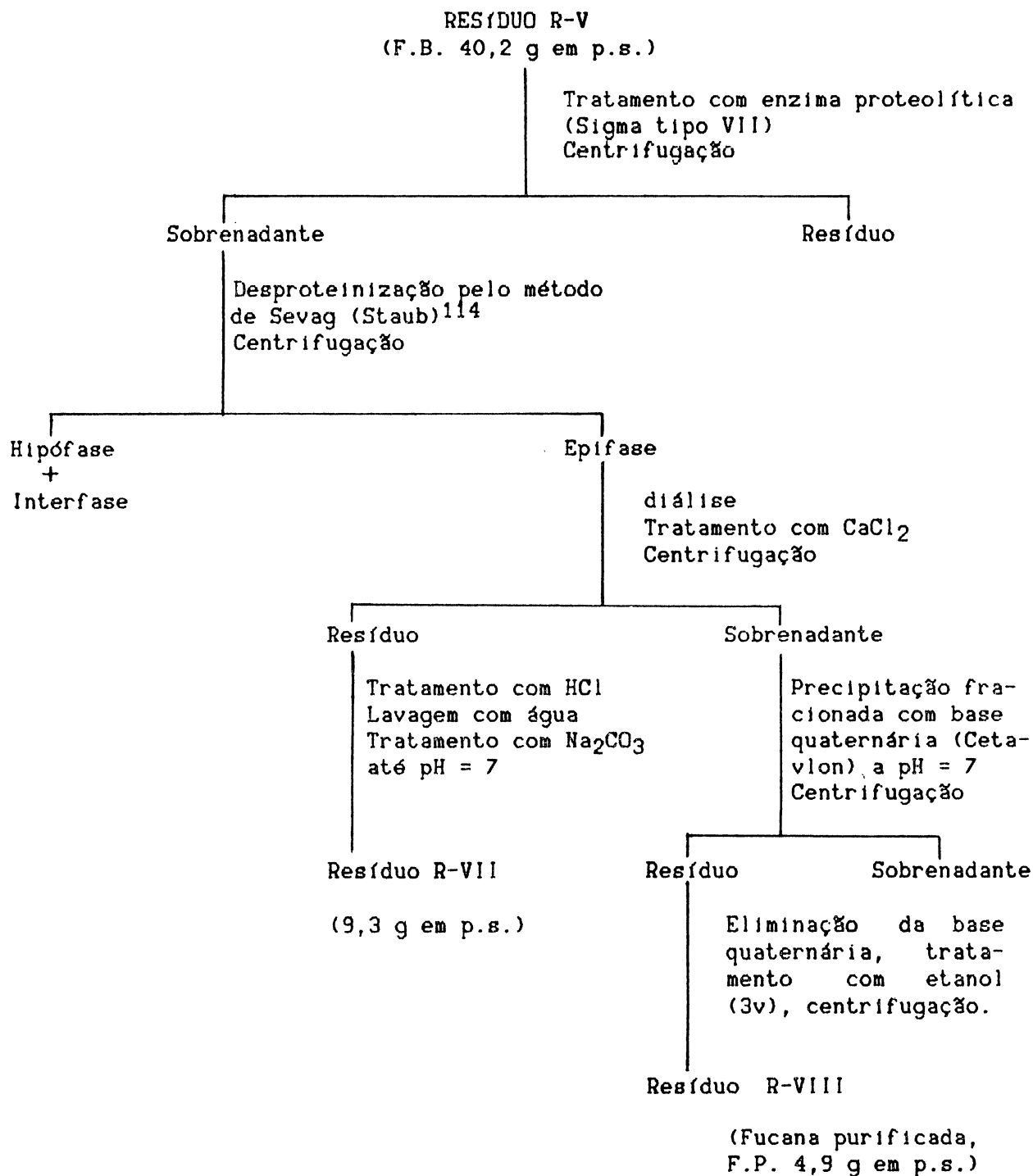
A fração FB, (40,2 g em p.s., 10% de proteína), após desproteínização, (enzimas proteolíticas e processo de SEVAG¹¹⁴), foi tratada com cloreto de cálcio para eliminação do ácido algínico contaminante (9,3 % de alginato de sódio em p.s. relativo ao pó cetônico).

As fucanas de algas pardas estão associadas com proteínas (proteoglicanas). A sargassana (S. linifolium^{1,2,3}), mesmo purificada continha ainda 3,3 % de proteína. . Por hidrólise ácida parcial, HUSSEIN et al.⁴⁹, obteve frações de polissacarídeos degradados contendo variáveis proporções de proteína, sendo que uma destas apresentava 67,3 % de proteína ligada à carboidrato (26,9 %).

Os complexos de polissacarídeos isolados de Ascophyllum nodosum⁷², continham proteína associada a carboidratos na proporção de 1,6 a 6,8 %.

Fucanas livre de proteína são de difícil obtenção, mesmo utilizando-se tratamento com enzimas proteolíticas, como ocorre com a fucana de L. brasiliensis.

ESQUEMA B

PURIFICAÇÃO DA FUCANA F.B. DE L. brasiliensis

A fucana com baixo teor proteico, (2%) e livre de ácido algínico, foi purificada por precipitação fracionada com base quaternária, (cetavlon) em pH=7, de modo semelhante ao utilizado por ANNO et al.⁵ para a purificação da fucana de Pelvetia wrightii.

A descomplexação da fucana-cetavlon foi realizada com cloreto de cálcio (0,5 M) e a fucana purificada, (FP), foi recuperada após tratamento com etanol, (3 V), com rendimento de 2,3 % em p.s. relativo ao pó cetônico.

Para o estabelecimento do teor real de fucana em alga parda, devem ser levados em consideração vários fatores como, variação sazonal, estocagem da alga, profundidade de coleta e principalmente os processos de extração e purificação.

PERCIVAL^{91,92}, demonstrou que é difícil a extração completa da fucana, mesmo utilizando diferentes processos de extração.

A fucana de Pelvetia canaliculata⁵², cristalizou com três moléculas de água por unidade monomérica, o que demonstra a grande habilidade de retenção de água, destes polímeros.

LESTANG & QUILLET⁶⁰, tem demonstrado que a proporção de íons magnésio associados a fucana de P. canaliculata é muito maior que a de íons sódio, embora água do mar contenha uma relação inversa. Deste que íons magnésio são altamente hidratados é sugerido que esta afinidade por magnésio protege a alga contra desidratação.

O teor de fucana sulfatada varia consideravelmente nas espécies de algas pardas investigadas. Teores de 2 % (Turbinaria murrayana⁷³ e Padina tetrastromatica¹⁰²) a 18 - 24% (Pelvetia canaliculata¹⁰⁴), bem como valores intermediários de 5% (Padina pavonia⁴⁹) a 17 - 18 % (Hymenothalia lorea e Bifurcaria bifurcata^{74,75}) tem sido assinalados para fucanas sulfatadas isoladas de algas pardas.

PERCIVAL & McDOWELL⁹⁶, associam tais variações como mecanismos de protecção a desidratação. As algas que crescem próximos à praia e estão mais expostas à atmosfera são portanto as mais susceptíveis à desidratação e são as que apresentam maiores teores de fucana, (Pelvetia canaliculata).

Deste modo o teor de 2,3 % encontrado para a fucana de L. brasiliensis é típico de uma alga que tem seu habitat a grande profundidade (20 -120 metros). Este valor é bem próximo daquele encontrado para outra Laminariacea, Lessonia nigrescens⁹³ (2,6%), a qual vive permanentemente submergida.

A fucana, (FP), de L. brasiliensis parcialmente purificada é constituída de fucose (42,7 %), xilose (1,7 %), manose (2,4 %), galactose (26 %) e glucose (27 %), Tabela IV. Ácido urônico (14 %) e sulfato (23 %) também estão presente nesta fucana, Tabela III. Estes dados estão em acordo com aqueles de outras algas pardas.

Embora a glucose tenha sido detectada em várias fucanas, inclusive na de L. brasiliensis, o envolvimento deste monossacarídeo como constituinte da molécula de fucana deve ser tomado com precaução.

TABELA III - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FUCANAS DE L. brasiliensis FRACIONADAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

FRAÇÃO	mg. recuperadas	sulfato ^c	Açúcar Total ^d	Acido Urônico ^e	Proteína ^f
mg %					
F.P. ^a	-----	20,3	69,0	14,0	2,0
F-H ₂ O ^b	58,0	1,5	69,0	4,0	8,2
F-0,25 ^b	2,0	1,7	30,0	6,8	6,1
F-0,50 ^b	103,0	1,8	80,0	21,0	8,1
F-0,75 ^b	711,5	23,0	72,5	16,8	1,0
F-1,00 ^b	14,0	23,4	85,0	13,6	7,8

a- FP, fucana purificada por cetavlon.

b- Frações polissacarídicas, obtidas da fucana FP, em coluna de DEAE-celulose (Cl⁻). Eluição com água, (F-H₂O) e solução de cloreto de potássio de molaridade crescente (0 a 1M, em etapas)= F-0,25; F-0,50; F-0,75 e F-1,00.

c- Dosado pelo processo gelatina-bário, segundo DODGSON & PRICE²⁰, expresso como SO₄⁼.

d- Método do fenol-ácido sulfúrico, DUBOIS *et al.*²¹, resultado expresso em fucose.

e- Dosado pelo método de BITTER & MUIR¹².

f- Determinado pelo método de LOWRY *et al.*⁶⁵

TABELA IV - ANÁLISE (c.f.g.)^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DAS FUCANAS FRACIONADAS EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE (Cl⁻)

Frações	fucose	xilose	manose	galactose	glucose
%					
F.P. ^b	42,7	1,7	2,4	26,0	27,2
F-0.25 ^c	10,7	49,5	7,5	11,2	21,1
F-0.50 ^c	46,1	21,6	10,1	11,8	10,4
F-0.75 ^c	63,1	4,0	2,7	16,0	14,2
F-1.00 ^c	67,0	4,0	1,0	27,8	0,2

a- c.f.g. dos acetatos de alditóis, (coluna capilar SP 2340 à 230°).

b- Fucana purificada por tratamento com cetavlon, aplicada à coluna de DEAE-celulose.

c- Frações obtidas por fracionamento da fucana F.P. em coluna de DEAE-celulose (Cl⁻).

PERCIVAL et al.⁹³, sugerem que a maioria das fucanas contendo glucose possam ser fucanas impurificadas com laminarana. A glucose como componente da molécula de fucana deve ser confirmada pelo isolamento de hetero-oligossacarídeos (produtos de hidrólise parcial), de polímeros altamente purificados.

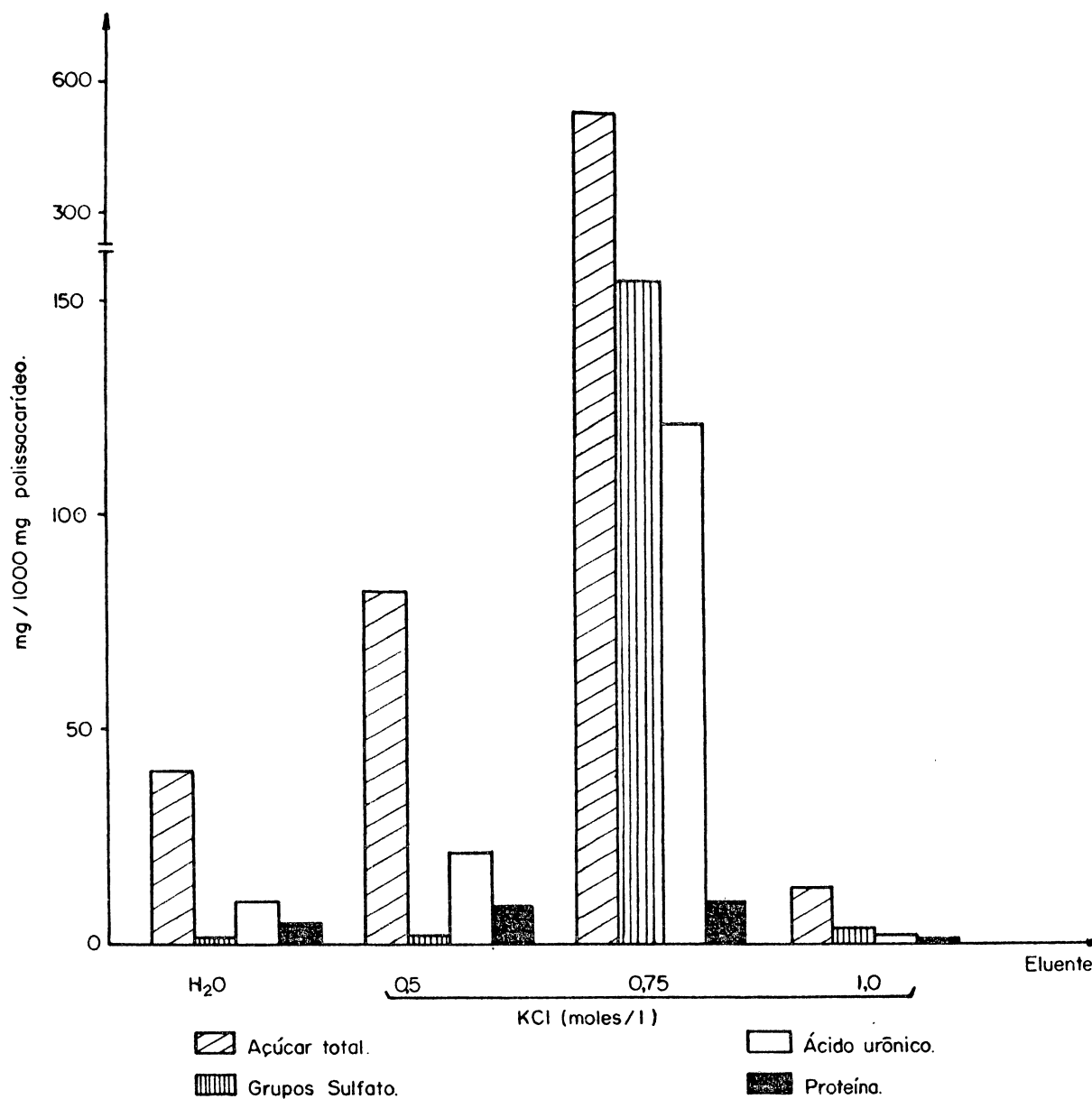
HUSSEIN et al.⁴⁹ isolaram um novo heteropolissacarídeo sulfatado de Padina pavonia que continha entre outros componentes, β -D-glucose e β -D-galactose substituídas em C-4.

Nos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial, as extremidades não redutoras eram constituídas de glucose e ou galactose.

O caracter altamente polidisperso das fucanas envolve uma dificuldade adicional no estudo destes polímeros. Portanto é de fundamental importância nas investigações de polímeros tão complexos como as fucanas, o estabelecimento de padronização dos métodos de extração, purificação e de processos analíticos, afim de uma melhor correlação dos dados obtidos em fucanas isoladas de diferentes espécies de algas.

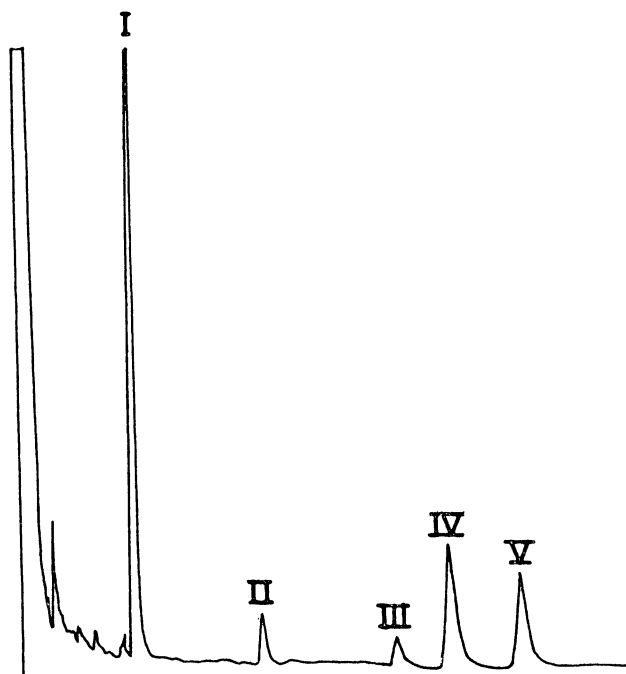
Numa tentativa de purificação ou de dissociação das prováveis frações polidispersas do polímero, a fucana FP foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, (Cl⁻). O fracionamento foi realizado utilizando como eluente, água e solução de cloreto de potássio de molaridade crescente (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 M). Figura 1.

FIGURA 1 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO DE FUCANA F.P. EM DEAE-CELULOSE (Cl^-), ELUIÇÃO POR ETAPAS.



- Uma amostra (1g) da fucana FP foi cromatografada em coluna (3,0x65 cm de d.i.), de DEAE-celulose utilizando o seguinte esquema de eluição: a - água; b - eluição por etapas com KCl de concentração crescente - 0,25 M, (F-025), 0,50 M (F-050), 0,75 M = (F-075), 1,00 M (F-100). As frações polissacarídicas foram analisadas para carboidrato total²¹, teor de grupos sulfato²⁰, ácidos urônicos¹² e proteínas⁶⁵.

FIGURA 2 - ANALISE POR c.f.g.^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FUCANA F-075^b.



a - Coluna capilar SP 2340 à 230°, na forma de acetato de alditol.

b - Fucana F-075, obtida por fracionamento em coluna de DEAE-celulose, hidrolisada com T.F.A. (1N por 3h à 100°).

- I - Fucitol penta- β -acetato
- II - Xilitol penta- β -acetato
- III - Manitol hexa- β -acetato
- IV - Galactitol hexa- β -acetato
- V - Glucitol hexa- β -acetato

Este fracionamento conduziu a obtenção de cinco subfrações com rendimento de 5,8 % (F-H20), 0,2 % (F-025), 10,3 % (F-050), 71,1 % (F-075); 1,4 % (F-100), respectivamente.

O perfil da eluição destas frações é compatível com um aumento do teor de grupos sulfato, de 1,5 a 23,4 %, e concomitantemente com o de fucose, de 10,7 à 67 %. (Tabela III e IV).

As diferentes frações polissacarídicas após hidrólise apresentavam a mesma composição em monossacarídeos neutros (fucose, xilose, manose, galactose e glucose), mas em proporção variável, (Tabela IV). Por este processo de purificação não foi possível dissociar proteína de polissacarídeo.

Portanto, o fracionamento em coluna de DEAE-celulose permitiu a obtenção de uma família de heterofucanas isoladas de L. brasiliensis e por conter ácido urônico podem ser enquadrada na classificação de KLOAREG et al.⁵², como heterofucana contendo ácido urônico.

Com excessão da fração F-025, as outras frações continham predominantemente fucose, podendo esta família de heterofucanas ser diferenciada em quatro grupos: a) ricas em xilose (F-025); b) ricas em manose (F-050); c) ricas em glucose (F-075); d) ricas em galactose (F-100).

A fração majoritária, (F-075; 72% de açúcar total em termos de fucose), foi selecionada para o estudo estrutural como modelo para a família de heterofucanas sulfatadas de L. brasiliensis, Figura 2, Tabela IV.

A fração F-075 contendo 16,8 % de ácido urônico, foi carboxi-reduzida, (F-075-EDC), utilizando-se o processo descrito por TAYLOR & CONRAD¹¹⁹, que envolve uma esterificação prévia do grupo carboxila do polímero (carbodiimida), seguido de redução (boridreto de sódio).

A análise por c.f.g. (Tabela V), dos produtos de hidrólise do polímero carboxi-reduzido, (acetato de alditol), revelou um aumento de manitol, (2,7 → 11,5 %) e de glucitol (14,2 → 27,0 %), proveniente da carboxi-redução do ácido manurônico e ácido glucurônico ou ácido gulurônico, respectivamente.

A presença de ácido manurônico e de ácido gulurônico poderia sugerir uma contaminação com ácido algínico. A ausência de 1,6-anidro- β -L-tri-O-acetil-gulose ou de gulose penta-O-acetato entre os produtos de hidrólise da fucana carboxi-reduzida quando analisado por c.f.g., exclui o ácido gulurônico como componente da fucana ou a presença de ácido algínico contaminante, Figura 3, Tabela VI. Deste modo o aumento de glucitol observado neste processo redutivo, origina-se do ácido glucurônico.

A homogeneidade da fucana F-075 foi testada frente as colunas de Bio-Gel P-100 e P-200, utilizando como eluente solução de cloreto de sódio 1M.

Em ambas colunas a fucana sulfatada foi eluída como um único pico simétrico, e com volume de eluição igual ao do azul de dextrana, sendo considerada como excluída de ambas as colunas. Este fato poderia ser explicado por um elevado peso molecular da fucana ou por uma tendência em formar agregados.

TABELA V - ANALISE POR c.f.g.^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA FUCANA F-075 E DA FUCANA F-075 CARBOXI-REDUZIDA.

Acetato de alditol	T ^b	F-075 ^c	F-075-EDC ^d
		%	
Fucitol	0,28	63,1	44,0
Xilitol	0,52	4,0	3,0
Manitol	0,77	2,7	11,5
Galactitol	0,87	16,0	14,5
Glucitol	1,00	14,2	27,0

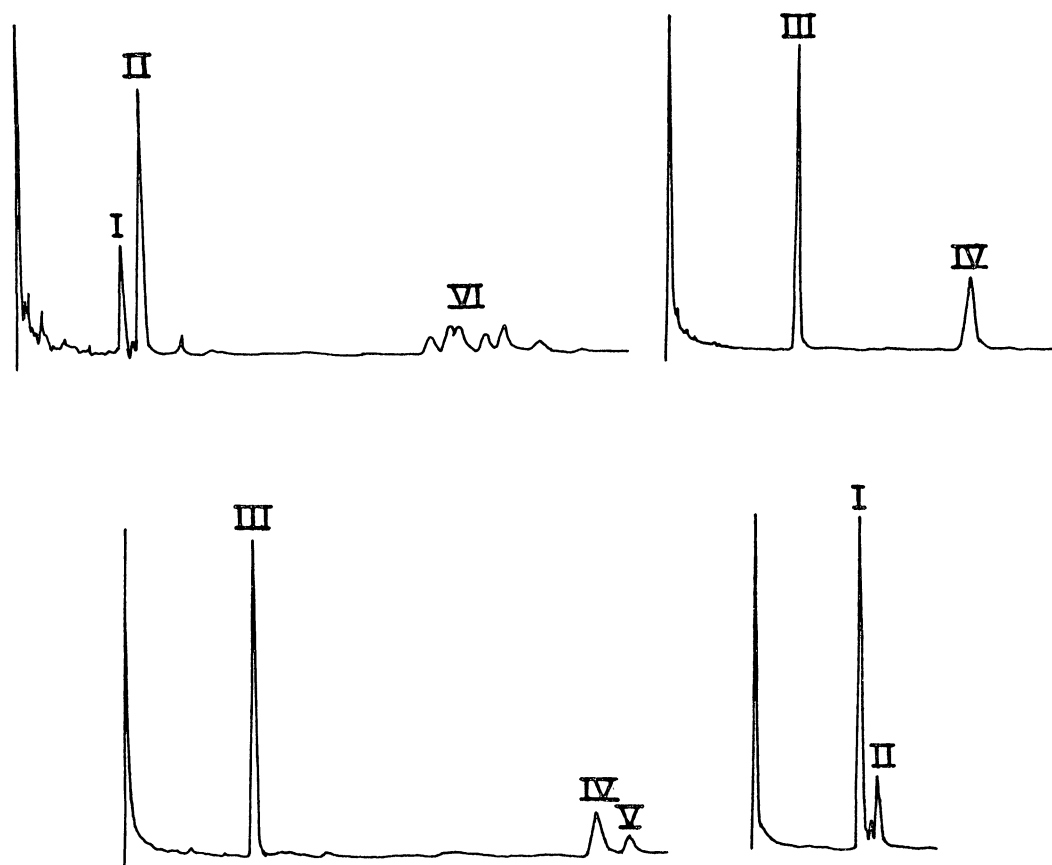
a- c.f.g., em coluna capilar SP2340 à 230°, de acetatos de alditóis.

b- Tempo de retenção relativo ao do glucitol hexa- β -acetato.

c- Fração eluida da coluna de DEAE-celulose, com KCl 0,75M.

d- Fração F-075 carboxi-reduzida, de acordo com o método de TAYLOR & CONRAD¹¹⁹.

FIGURA 3 - ANALISE POR c.f.g.^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE, (GLICOSÍDEOS), DAS FUCANAS F-075 E F-075-EDC.



- I e II - fucose tetra- β -acetato
 III - 1,6 anidro - α -tri- β -acetil gulose
 IV - gulitol hexa- β -acetato
 V - gulose hexa- β -acetato
 VI - manose hexa- β -acetato
 galactose hexa- β -acetato
 glucose hexa- β -acetato

a - c.f.g. em coluna capilar SP 2340 à 205°.

A - F-075-EDC, fucana carboxi-reduzida, tratada como em "A".

B - Gulose tratada com T.F.A. (1N por 3h à 100°) e acetilada.

C - Gulose tratada com T.F.A. (1N por 8h à 100°), reduzida com NaBH₄ e acetilada.

D - Fucose tetra- β -acetato, acetilada (piridina: anidrido acético).

TABELA VI - ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DAS FUCANAS F-075 E F-075-EDC, (c.f.g.)^a

Componente	T ^b								
Fucose tetra- β -acetato ^c	1,78	2,03							
1,6 anidro - β - α -gulose ^d	---	2,10	6,88	7,32					
Glucitol hexa- β -acetato ^d	---	2,10	6,88	7,32					
Gulose-hexa- β -acetato ^e	---	2,10	---	7,32					
F-075 ^f	1,78	2,03	6,34	6,47	6,84	7,1	7,61	8,14	
F-075-EDC ^g	1,78	2,03	6,34	6,47	6,84	7,1	7,61	8,14	

a- c.f.g. dos acetatos de alditóis (coluna capilar SP 2340 à 205°)

b- Tempo de retenção relativo à 1,5-di- β -acetil 2,3,4,6-tetra- β -metil glucitol.

c- α -fucose, (Sigma, U.S.A.), acetilada (piridina: anidrido acético 1:1).

d- Obtida por tratamento ácido da α -gulose (T.F.A. 1N por 8h à 100°); redução da gulose residual, com boridreto de sódio seguido de acetilação.

e- Obtida por tratamento ácido da α -gulose (TFA 1N por 3h à 100°) e acetilada (piridina:anidrido acético 1:1).

f- Produtos de hidrólise da fucana F-075 (TFA 1N por 3h à 100°), acetilados (piridina:anidrido 1:1).

g- Produtos de hidrólise ácida da fucana F-075, carboxi reduzida¹¹⁹, hidrolisada e acetilada como em "f".

Com a finalidade de comprovar tal agregação a fucana foi cromatografada em uma coluna de Bio-Gel P-200 utilizando uréia 7 M como eluente, (Figura 4). Neste processo o volume de eluição da fucana F-075, ($V_e = 14,8$ ml), foi maior do que o do azul de dextrana, ($V_o = 7$ ml).

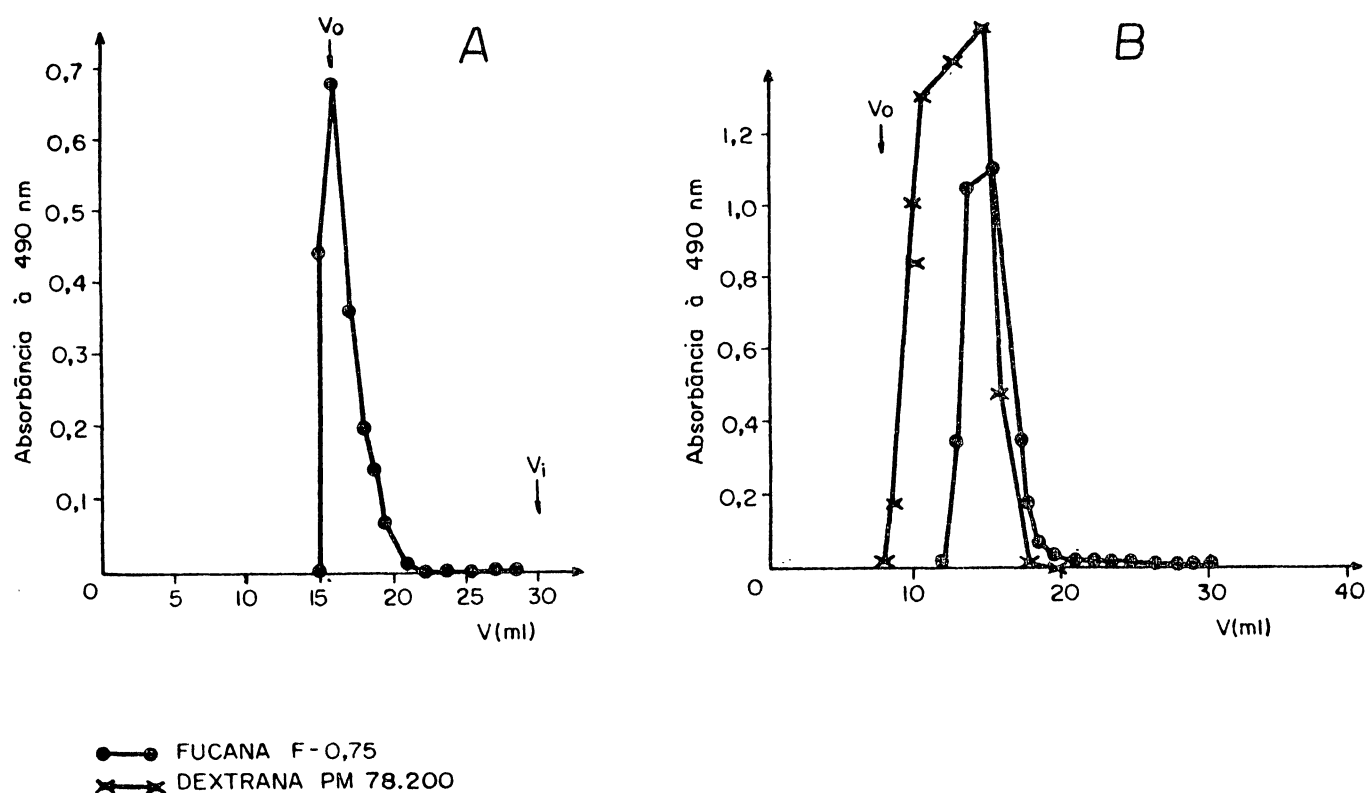
A inclusão da fucana F-075 neste gel, poderia ser explicado pela ocorrência de desagregação do polímero, devido ao rompimento pela uréia de ligações não covalentes dos agregados.

Segundo BRUNNGRABER & BROWN¹⁵, o polímero desagregado apresenta forma e peso molecular distintos em relação ao complexo agregado, o que explicaria a exclusão (V_e de 17 e 16,8 ml respectivamente) da fucana em Bio-Gel P-100 ou P-200, quando se utiliza cloreto de sódio como eluente.

Nas mesmas condições anteriores de eluição (uréia 7 M) uma dextrana padrão (sigma) de peso molecular 78.200 foi eluída num volume semelhante (14,8 ml) ao da heterofucana F-075. Deste modo, a fucana de L. brasiliensis, apresenta um peso molecular em torno de 78.000.

O peso molecular de fucanas foi pouco investigado. O'NEILL⁸⁵, obteve um peso molecular de 130.000 ± 20.000 , (osmometria) para a fucana de Fucus vesiculosus enquanto que o valor obtido por BERNARDI & SPRINGER¹¹, foi de 78.000, (ultracentrifugação). Estes dados são inconsistentes e devem ser melhor investigados.

FIGURA 4 - CROMATOGRAFAS DA FUCANA F-075 EM COLUNAS DE GÉIS.



A - Bio-Gel P-200 (1x71 cm de d.i.)
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 1 M
 Frações de 1 ml
 Volume de eluição do azul de dextrana (V_0): 7ml
 Volume de eluição do cloreto de cobalto (V_i): 60 ml

B - Bio-Gel P-200 (1x70 cm de d.i.)
 Eluente: Solução de uréia 7 M
 Frações de 1 ml
 Volume de eluição do azul de dextrana: 7ml

Após eluição da fucana F-075, foi analisado o perfil de eluição de dextrana de PM= 78.200.

A configuração absoluta das unidades de fucose na heterofucana de L. brasiliensis foi investigada por derivatização da fucose, liberada por hidrólise total do polímero, com (-)-2-octanol seguido de acetilação do correspondente octil-fucosídeo⁵⁹, (Tabela VII, Figura 5).

A análise cromatográfica demonstrou a presença de quatro componentes com T, (relativo ao 1,5-di- β -acetil-2,3,4,6-tetra- β -metil-glucitol), de 1,34 (médio); 1,44 (grande); 1,92 (pequeno) e 2,5 (médio).

Derivatização de α -fucose (sigma), mostrou os mesmos componentes, e praticamente nas mesmas proporções, enquanto que a β -fucose, (sigma) apresentou componentes com tempo de retenção distintos (T = 1,3 (médio); 1,54 (grande) e 2,08 (médio)).

Estes dados, juntamente, com o valor da rotação ótica da fucana F-075, $[\alpha]_D -77$ (c, 0,55 em água) indicam que as porções da molécula contendo fucose da heterofucana são constituídas somente do α -enantiômero, Tabela VIII.

Embora seja assumido que as algas pardas sintetizam α -fucose, esta averiguação tem sido realizada quase que exclusivamente pela determinação do valor da rotação ótica do polímero, que varia em média de -75 a -140, nas diferentes heterofucanas investigadas.

Recentemente fucanas isoladas de A. nodosum, M. pyriferá, B. bifurcata, P. pavonia e P. canaliculata tiveram a configuração absoluta da fucose determinada pela derivatização com (R)-2-butanol ou (R,S)-2-butanol¹⁴.

TABELA VII - ANÁLISE POR c.f.g.^a DE OCTIL GLICOSÍDEOS

T ^b	F-075 ^c	L-fucose ^d	D-fucose ^e
%			
1,30	---	---	9,0 (M)
1,34	21,5 (M)	21,0 (M)	---
1,44	50,0 (G)	58,0 (G)	---
1,54	---	---	70,0 (G)
1,92	6,0 (P)	4,0 (P)	---
2,08	---	---	21,0 (M)
2,50	23,0 (M)	17,0 (M)	---

a - c.f.g. em coluna capilar SP 2340 à 205°.

b - Tempo de retenção relativo à 1,5-di- β -acetil-2,3,4,6-tetra- β -metil-glucitol.

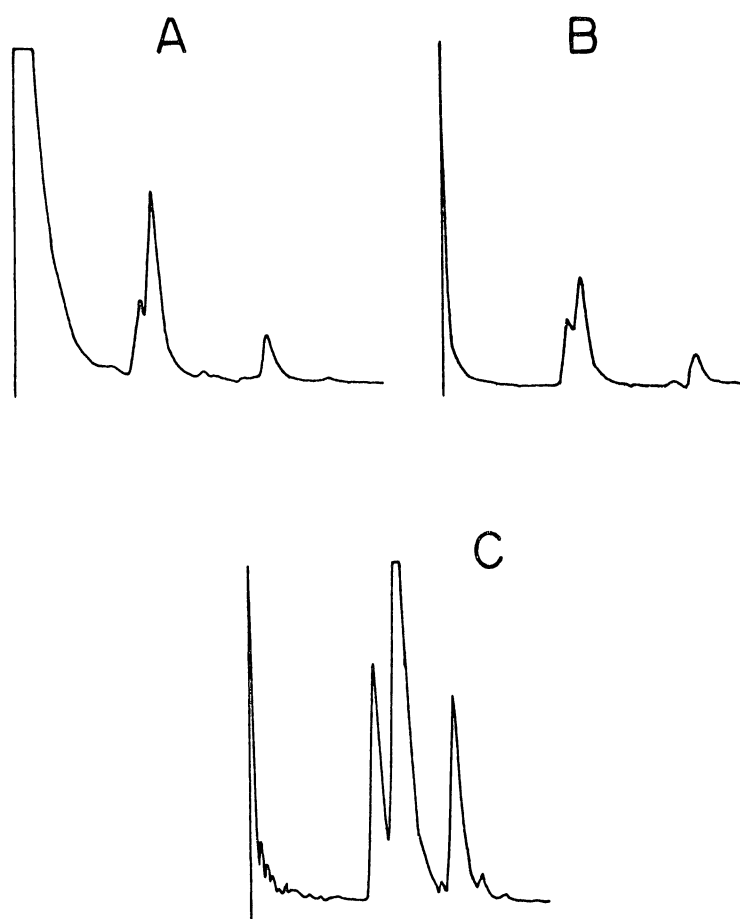
c - Fucana F-07 hidrolisada (T.F.A. 1N por 3h à 100°), derivatizada com (-)-2-octanol, (130° por 15h), e acetilada de acordo com o método descrito por LEONTEIN et al.⁵⁹.

d,e - L-fucose e β -fucose, (Sigma U.S.A), derivatizadas com (-)-2-octanol nas condições descritas em "c".

f - Percentagem das áreas dos picos calculadas por integração automática.

CHAVE - G - grande; M - médio; P - pequeno.

FIGURA 5 - ANÁLISE POR c.f.g.^a DE (-)-2-OCTIL GLICOSÍDEOS, OBTIDOS APÓS HIDRÓ-
LISE DA FUCANA F-075



a - c.f.g. em coluna capilar SP 2340 à 205°.

A - Fucana F-075 hidrolisada (TFA 1N por 3h à 100°), glicosilada com (-)-2-oc-
tanol, e acetilada, segundo LEOTEIN et al.⁵⁹

B - Padrão de α -fucose, glicosilada como em "A".

C - Padrão de β -fucose, glicosilada como em "A".

TABELA VIII - ROTAÇÃO ÓTICA DE FUCANAS E DE SEUS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL.

FRAÇÃO ^c	$[\alpha]_D^a$	c ^b
FP	- 28,8	0,21
F-025	+ 0,5	0,11
F-050	- 65,0	0,14
F-075	- 77,2	0,52
F-1,00	- 70,0	0,20
F-075-EDC	- 75,0	0,32
FD-1	+ 5,0	0,40
FD-2	+ 11,4	0,63
FD-1-EDC	+ 14,0	0,55
FD-11-EDC	+ 8,1	0,57

a- Rotação ótica, determinada em soluções aquosas, à 25°.

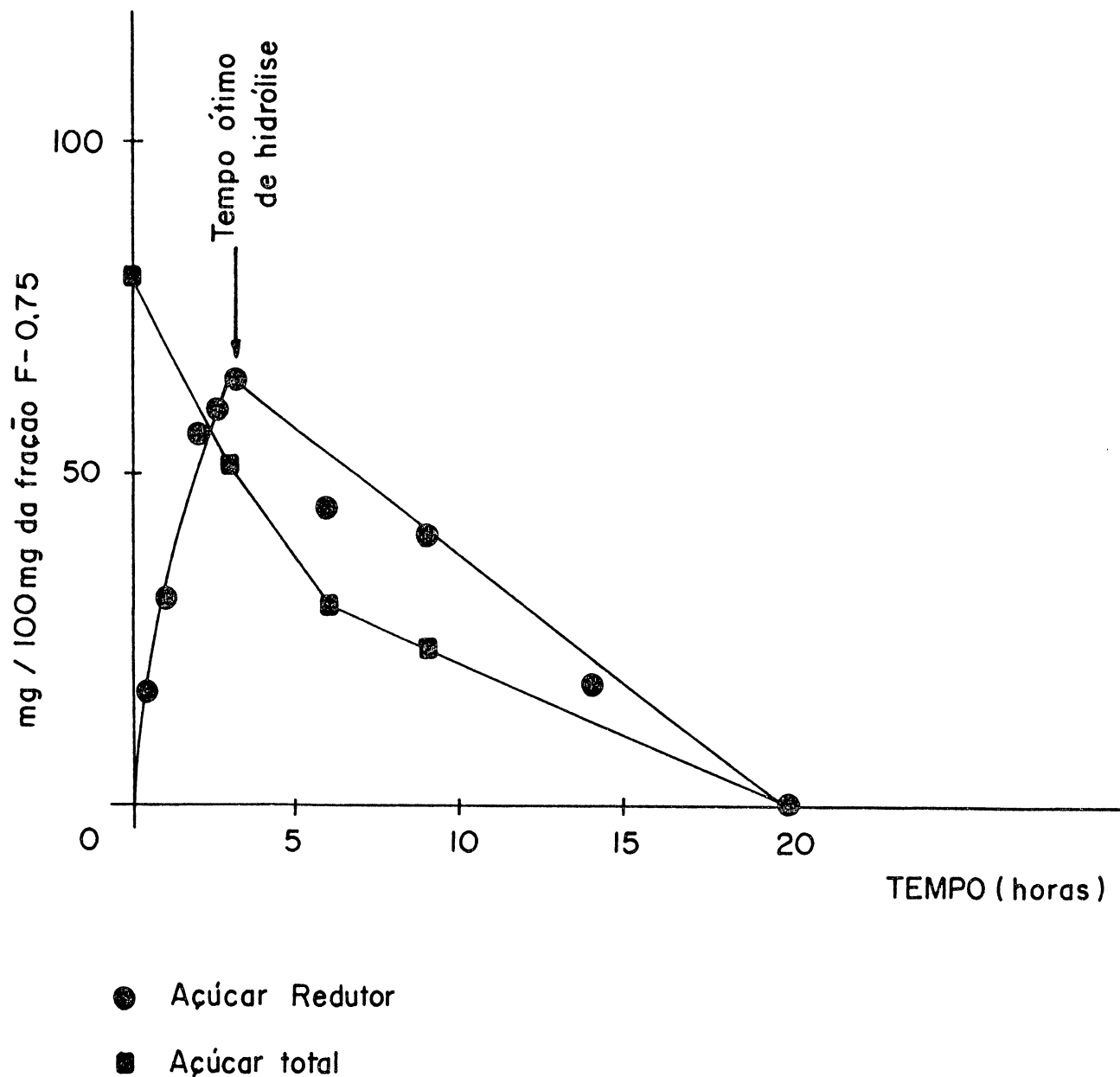
b- Concentração dos polissacarídeos expressos em g%.

c- As siglas estão expressas na tabela nº X e XII e Figura 1.

A grande variação do valor de rotação ótica das heterofucanas tem sido atribuída a vários fatores como grau de purificação da amostra, proporção de cadeias de α -L-fucose e anomericidade dos demais açúcares constituintes da molécula. Para *sargassana*^{1,2,3}, contendo baixo teor de α -L-fucose (2,5%), o valor negativo da rotação ótica (-78,5) é atribuída a β -D-anomericidade dos demais componentes. Por outro lado, valores elevados de rotação ótica negativa é geralmente encontrado em polímeros com alto teor de unidades de α -L-fucopiranosil. A fucogalactana de *Pelvetia wrightii*⁵, (51 % de fucose) apresenta um valor de rotação ótica de -141°. O mesmo valor é encontrado para a fucana de *Himmanthalia lorea*⁹⁵, (56,7% de fucose).

Por outro lado MIAN & PERCIVAL^{74,75}, fracionaram em coluna de DEAE-celulose, a fucana de *H. lorea* em frações que apresentavam rotação ótica de -87 (2,5 M de fucose); -58 (10 M de fucose) e de -132° (14 M de fucose), respectivamente. Isto indica que não se deve correlacionar o valor de rotação ótica com o teor de α -L-fucose, sem levar em consideração a percentagem e anomericidade dos demais componentes da molécula. Estes fatos explicam a rotação ótica de -77,2 da heterofucana de *L. brasiliensis*, (63,1 % de fucose).

Para a determinação da composição dos açúcares neutros, a hidrólise da fucana F-075, (T.F.A. 1N por 100°), foi acompanhada pela determinação de açúcar total e açúcar redutor, Figura 5. Após 3 horas de hidrólise, obteve-se um rendimento de 81% de açúcar redutor (relativo ao açúcar total). Após 3 h, observou-se por c.f.g. e por c.p. um decréscimo progressivo e acentuado no teor da fucose, até completa degradação do polímero, (20 h de hidrólise).

FIGURA 6 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO ÓTIMO DE HIDRÓLISE^a DA FUCANA F-075.

a. Fucana F-075 foi hidrolisada com TFA 1N por diferentes intervalos de tempo (0,5 → 20h), à 100°. O acompanhamento foi realizado pela análise de carboidrato total (DUBOIS)²⁰ e açúcar redutor (SOMOGYI & NELSON)¹¹².

Grupos sulfato (semi-éster) tem sido observado em diversos polissacarídeos de Phaeophyta, embora não seja específico desta divisão. Galactanas sulfatadas ocorrem na maioria das Rodophytas, (ágar, carragenanas, porfinanas), e raramente em Phaeophytas.

A heterofucana F-075 de L. brasiliensis, (72,5% de açúcar total), apresenta um teor de 23 % de semi-éster de sulfato, (Tabela III). A relação molar fucose (c.f.g.): sulfato²⁰ de 1,63 é superestimada por não levar em consideração a percentagem de ácido urônico. No polímero carboxi-reduzido esta relação é de 1,3. Deste modo, na heterofucana de L. brasiliensis de cada quatro unidades de fucose, três são sulfatadas.

Tentativas de dessulfatação desta molécula não tiveram nenhum sucesso. Nenhuma dessulfatação ocorre por tratamento do polímero com ácido clorídrico-metanol 0,075 M, como atestado pela recuperação total do polímero sulfatado, (relação fucose: sulfato, 1,63) e testes de viscosidade. Entretanto, o aumento da concentração de ácido (0,1 M), levou a uma completa degradação do polímero.

A grande labilidade à ácido diluído, característica de polímero contendo deoxy-açúcar, seria em parte compensada, pelo posicionamento de um grupo elétron-atraente, como grupo sulfato em C-2 da fucose. Isto tornaria os eletrons não ligantes do oxigênio da ligação glicosídica menos disponíveis ao ataque por H⁺, conferindo a esta ligação grande resistência a ação de ácido. Estes fatos, sugerem uma indicação de que o grupo sulfato não se encontra em carbono C-2 das unidades de fucose.

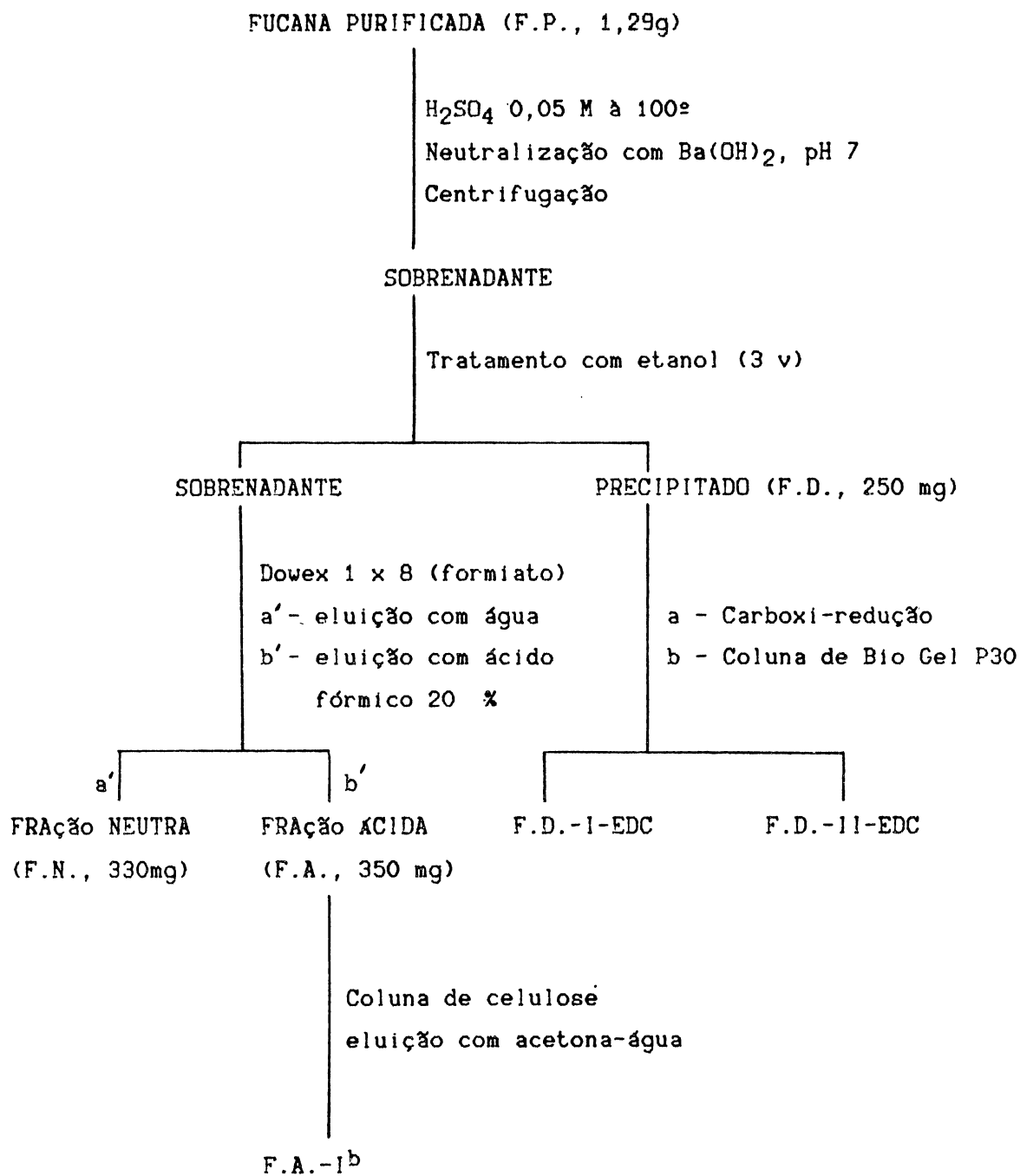
O posicionamento do grupo sulfato no carbono C-4 da α -fucose foi confirmado pelo isolamento de α -fucose 4-sulfato em produtos de hidrólise da fucana, (fucose: sulfato, 1:1; IV, vibração de alongamento em 845 cm^{-1} , típica de grupo sulfato em posição axial; açúcar total: redutor 1:1; oxidação com periodato: consumo de ~ 2 moles de ácido fórmico por mol de açúcar, Esquema C, Tabela IX, Figura 7.

O composto com forte fluorescência sob U.V, apresentava o mesmo comportamento cromatográfico, (R_{glc} 0,82) e eletroforético, que o da fucose 4-sulfato isolada por ANNO *et al.*⁴ da fucana de *Pelvetia wrightii*, Figura 8 e 9.

Um dado adicional do posicionamento do grupo sulfato no carbono C-4, foi obtido pela análise de metilação do glicosídeo metilado de fucose 4-sulfato. Após hidrólise o composto era compatível, (c.f.g. - acetato de alditol), com 2,3-di-*D*-metil-fucitol. Também foi isolado, por hidrólise parcial, uma fucobiose sulfatada, com forte fluorescência sob U.V. Embora não tenha sido completamente caracterizada, este componente apresentava comportamento cromatográfico (R_{glc} de 0,55), semelhante ao obtido por ANNO *et al.*⁴ para 2-*O*- α - α - α -fucopiranosil- α -fucose, sulfatada em C-4, da unidade não redutora, Figura 8 e 9.

Outras tentativas de dessulfatação por outros processos, como o tratamento da fucana em presença DMSO-piridina^{50,79,123}, (processo solvolítico), não se mostrou eficiente, quando aplicado a este polímero.

ESQUEMA C

HIDRÓLISE ACIDA PARCIAL DA FUCANA DE L. brasiliensis^a

a. Segundo ANNO *et al.*⁴

b. Eluida com acetona-H₂O 8:1

TABELA IX - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA (F.P.)^a

fração	Sulfato ^b	A.Total ^c	Ac.Urônico ^d	Relação molar Fuçose/Sulfato	A.Total/Redutor ^e
mg %					
FD-1	0,0	78,0	42,7	---	---
FA-1	16,6	32,4	0,0	1:1,1	1:1
FN	2,0	66,5	0,0	---	---

a- Hidrólise ácida parcial da fração F.P., segundo processo de Anno *et al.*⁴, sendo a FD-1 obtida do hidrolisado ácido por precipitação com etanol (75%); FN e FA, (frações solúveis em etanol), e separadas em coluna de Dowex 1X8 (formiato), eluidas com água e ácido fórmico, respectivamente.

A F.A. foi repurificada em coluna de celulose (eluição acetona:água, 8:1) e recebeu o nome de FA-1.

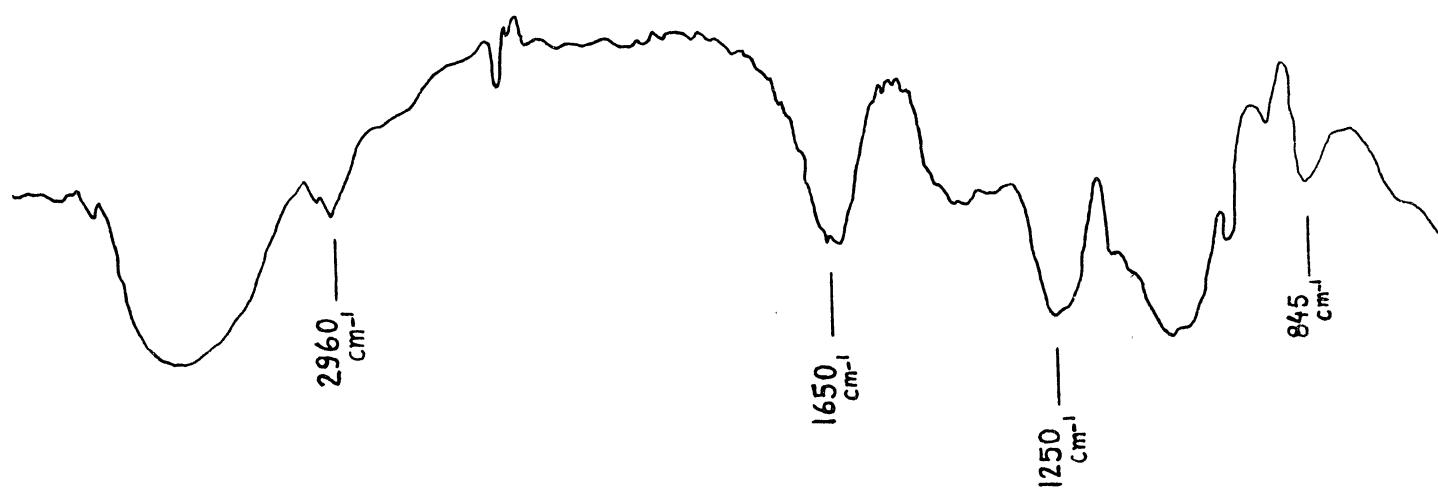
b- Segundo método de DOGDSON & PRICE²⁰.

c- Método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS, *et al.*²¹).

d- Método do carbazol segundo BITTER & MUIR¹².

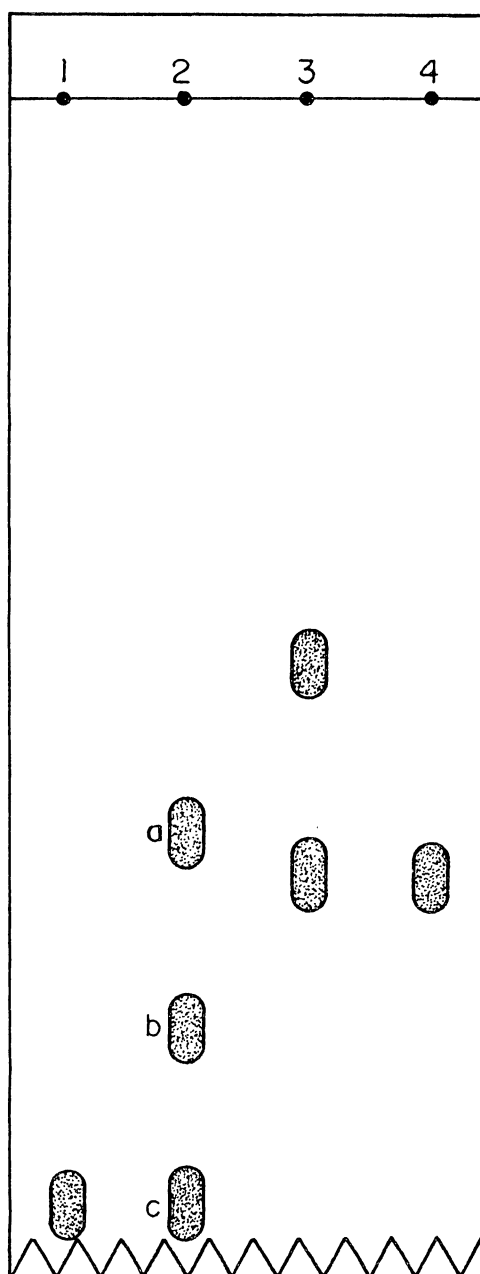
e- Método de SOMOGY & NELSON¹¹².

FIGURA 7 - ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO.



A - Fucana F-075, analisada na forma sólida (pastilha de KBr).

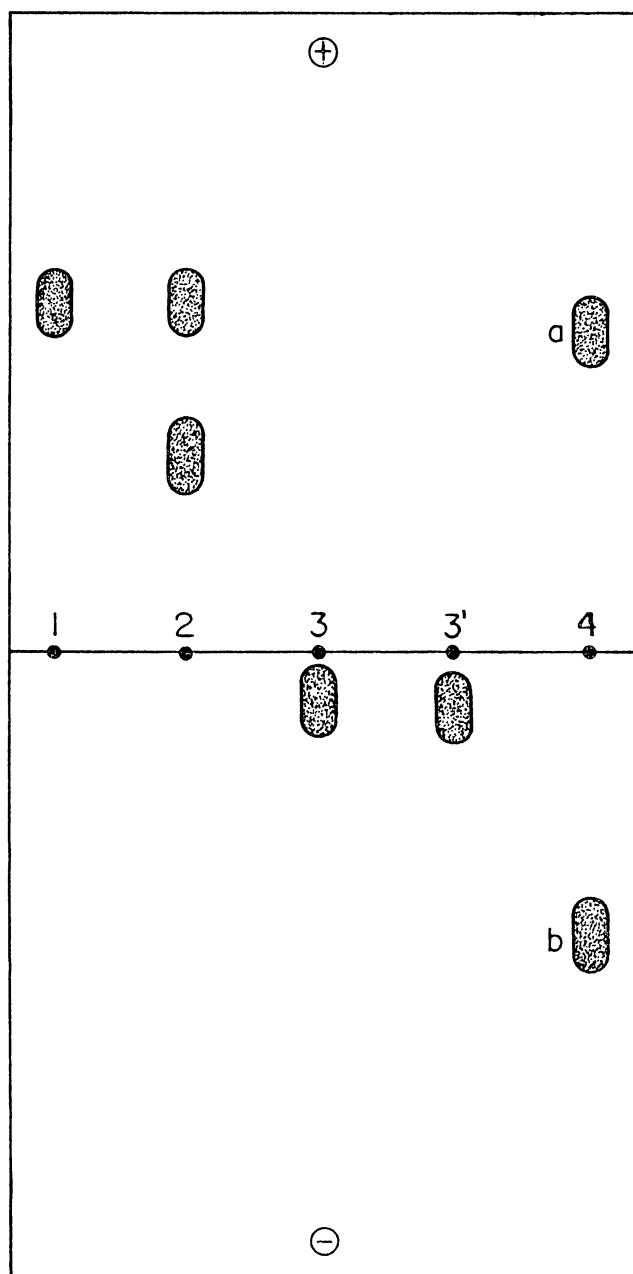
FIGURA 8 - ANÁLISE POR c.p. DESCENDENTE DA FRAÇÃO FA, OBTIDA POR HIDRÓLISE
ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P.



Fase móvel: B, Visualizador: II, Tempo de corrida: 120 horas

- 1 - Fração FA hidrólise total (TFA 1N, 3h, 100°)
- 2 - Padrões: a - ácido glucurônico, b - glucose, c - fucose
- 3 - Fração FA ($R_{glcA} = 0,82$ e $0,55$)
- 4 - Fração FA-I ($R_{glcA} = 0,82$)

FIGURA 9 - ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM (1700 V ~15 mA) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P.



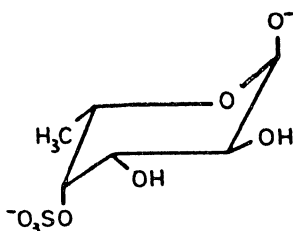
- Tampão eletroforético: ácido acético 0,1 M-Piridina, pH 6,5, visualizador "a"

1. Fração FA-I
2. Fração FA
3. Fração FA hidrolisada (T.F.A. 1N por 3h à 100°)
- 3'. Fração FA-I, como em 3.
4. Padrões: a - ácido glucurônico
b - N-acetil-glucosamina

Tratamento alcalino⁹⁷ não alterou a relação fucose: sulfato, (c.f.g.), nem levou a formação de 3,6-anidro-hexose, o que exclui a presença de sulfato em C-3 ou C-6, nas demais hexoses constituintes do polímero.

Nesta molécula, o posicionamento axial do grupo sulfato, (I.V. 845 cm^{-1}) em C-4 e sua resistência a dessulfatação por tratamento alcalino são indicativos de um grupo sulfato e de um grupo hidroxila ocupando posição cis-vicinal. O posicionamento trans-vicinal deste grupo conferiria grande labilidade a alcali com a subsequente eliminação do grupo sulfato e formação de epóxidos correspondentes. (Apêndice I)

Os fatores de instabilidade conformacional da α -fucose 4-sulfato quando testados em modelos moleculares admitem para esta molécula uma conformação 1C_4 , (I) com um grupo sulfato axial C-4. Nenhuma absorção na região de 820 cm^{-1} do espectro de I.V. foi observado na fucana de L. brasiliensis, quando então participaria o grupo sulfato em posição equatorial 4C_1 .



I

A ligação α -L-fucosil na heterofucana de L. brasiliensis foi comprovada por espectroscopia de r.n.m.- ^{13}C . Apesar da multiplicidade de picos na região C-1 o valor de δ 99,9 foi atribuído ao C-1 de unidades de α -L-fucosil, e aquele de δ 16,3 ao CH_3 da fucose.

O espectro de ^1H n.m.r. não foi realizado nesta fucana. Entretanto, KLOAREG et al.⁵², atribuiu o valor de τ 5,30 (r.n.m. ^1H) ao hidrogênio α -anomerico, (equatorial), da fucose em fucana de P. canaliculata. Este valor é inferior àquele, (τ 5,43), obtido por VILLAROEL e ZANLUNGO para a fucana de Lessonia flavicans.

Estes dados evidenciam que as unidades de fucosil estão numa conformação predominante $^1\text{C}_4$, como previstas em modelos moleculares.

Em virtude da fucana de L. brasiliensis, constituir-se de uma família de polissacarídeos correlacionados é de difícil interpretação os resultados obtidos no polímero original. Para contornar essa dificuldade, vários esquemas de fracionamento do polímero original foram utilizados numa tentativa de esclarecer a estrutura dos componentes dessa família.

A fração FP, purificada por cetavlon foi parcialmente degradada (Esquema C), o polímero resultante, FD-1 (Tabela X), era constituído principalmente de galactose (64,6 %), contendo os mesmos monossacarídeos do polímero original. Quando a fração FD-1 foi submetida a um processo de carboxi-redução, observou-se um aumento no teor de manose e de glucose, (FD-2xEDC), Tabela X, Figura 10, Esquema D. Embora tal fato pudesse sugerir uma contaminação da fucana com ácido algínico, em experimentos posteriores a fração FD-2xEDC quando submetida a hidrólise e

diretamente acetilada, (c.f.g.), não apresentou o composto 1,6-anidro- β - L -gulose, (equilíbrio com gulose). Tal fato exclui a presença de ácido glucurônico ou contaminação por ácido algínico.

Por fracionamento em Bio-Gel P-30 foi comprovado que a fração FD-2xEDC, era constituída de polímeros correlatos, um rico em manose, (FD-1-EDC, majoritário, $[\alpha]_D +14$) outro rico em galactose, (FD-11-EDC, $[\alpha]_D +8,1$), Tabela VIII e X, Figura 11.

Deste modo a fração FD-1, $[\alpha]_D +5,0$ (c, 0,04 água), é constituída principalmente de galactose, e de ácidos glucurônico, (Figura 16), e manurônico, (42,7 % dosado pelo carbazol), Tabela VIII e X.

Os glicosídeos de álcool secundário de quiral, (-)-2-octanol da FD-1 eram compatíveis com a L -fucose e L -galactose, Tabela XI). A presença deste último enantiômero ainda não havia sido evidenciado em fucanas de Phaeophytas. Para estudar-se o envolvimento dos ácidos urônicos na fucana de L. brasiliensis uma fração mais purificada, F-075 (fracionamento em DEAE-celulose), foi submetida ao mesmo tratamento degradativo de FP. A fração degradada FD-2, $[\alpha]_D +11,44$ (c, 0,63 água), rica em manose e glucose, (Tabela XII), também forneceu por coluna de Bio-Gel P30, Figura 12, duas subfrações (FD-A e FD-B). Glucose não foi detectada na subfração majoritária (FD-A, 64% de rendimento), rica em manose. Esta fração apresenta um alto grau de polimerização (Tabela XIII) (g.p.= 61) em relação a FD-B (g.p = 31; 33 % de rendimento, rica em xilose), Tabela XII. A presença de ácido glucurônico na fração FD-A foi comprovada pelo aparecimento de glucose entre os produtos de hidrólise do correspondente polímero carboxi-reduzido, (FD-A-2xEDC), Tabela XII.

TABELA X - ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA FRAÇÃO DEGRADADA FD-1, POR c.f.g.^a

ACETATO DE ALDITOL	T ^b	FP ^c	FD-1 ^d	FD-2XEDC ^e	FD-1-EDC ^f	FD-11-EDC ^g
	%					
Fucitol	0.30	42.7	10.0	7.6	9.2	7.0
Xilitol	0.54	1.7	6.0	1.6	3.6	3.1
Manitol	0.77	2.4	17.0	30.4	43.0	18.0
Galactitol	0.86	26.0	64.6	47.0	5.2	53.4
Glucitol	1.00	27.2	2.4	13.4	39.0	18.5

a - Análise por c.f.g. dos acetatos de alditóis, (SP 2340 à 220°).

b - Tempo de retenção relativo ao glucitol hexa-O-acetato.

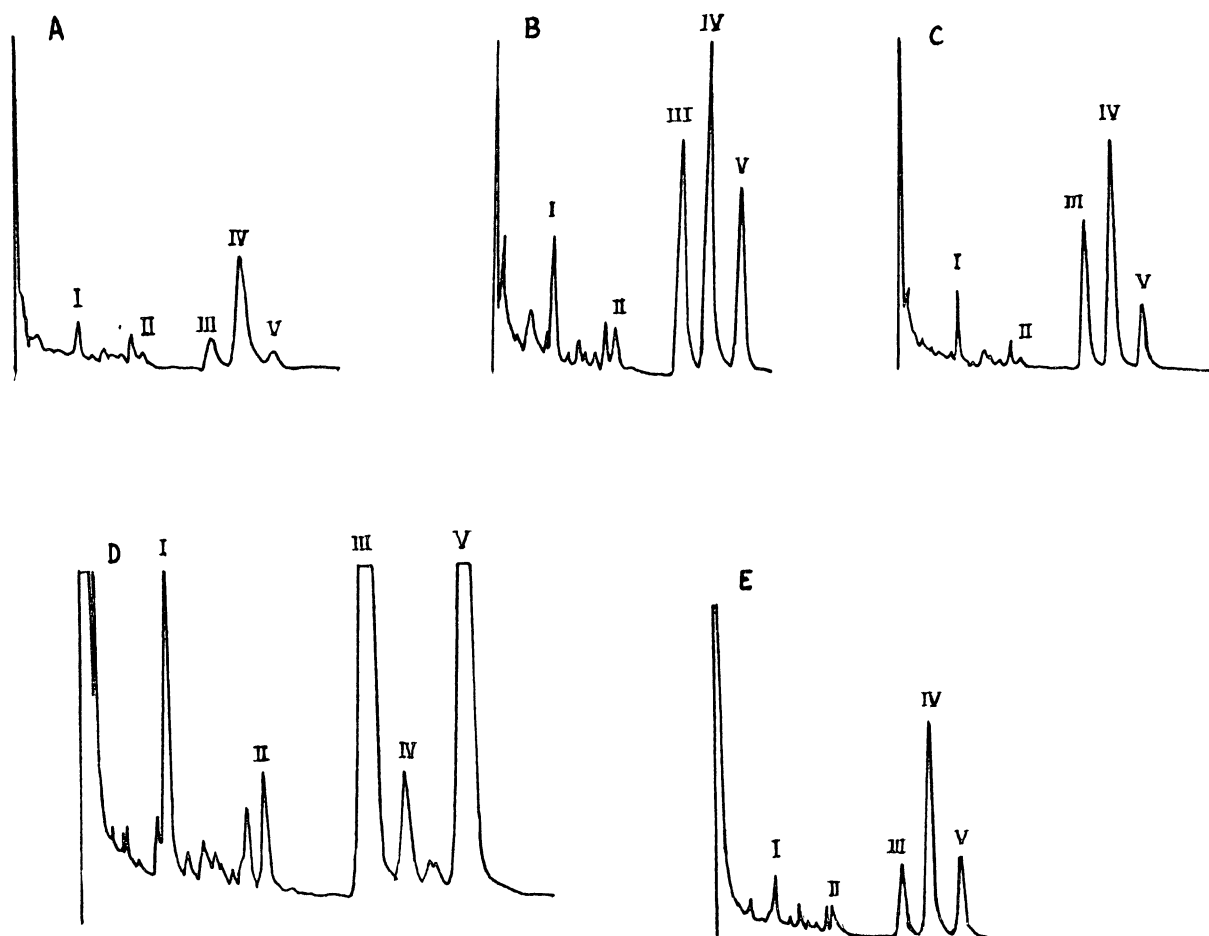
c - Purificada por Cetavlon.

d - Fração degradada de FP.

e - Carboxi-redução de FD-1, (ester de carbodiimida / NaBH₄)

f,g - Sub-frações de FD-2xEDC, obtidas por fracionamento em Bio-Gel P-30.

FIGURA 10 - ANÁLISE POR c.f.g.^a DA FRAÇÃO FD-1, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P.

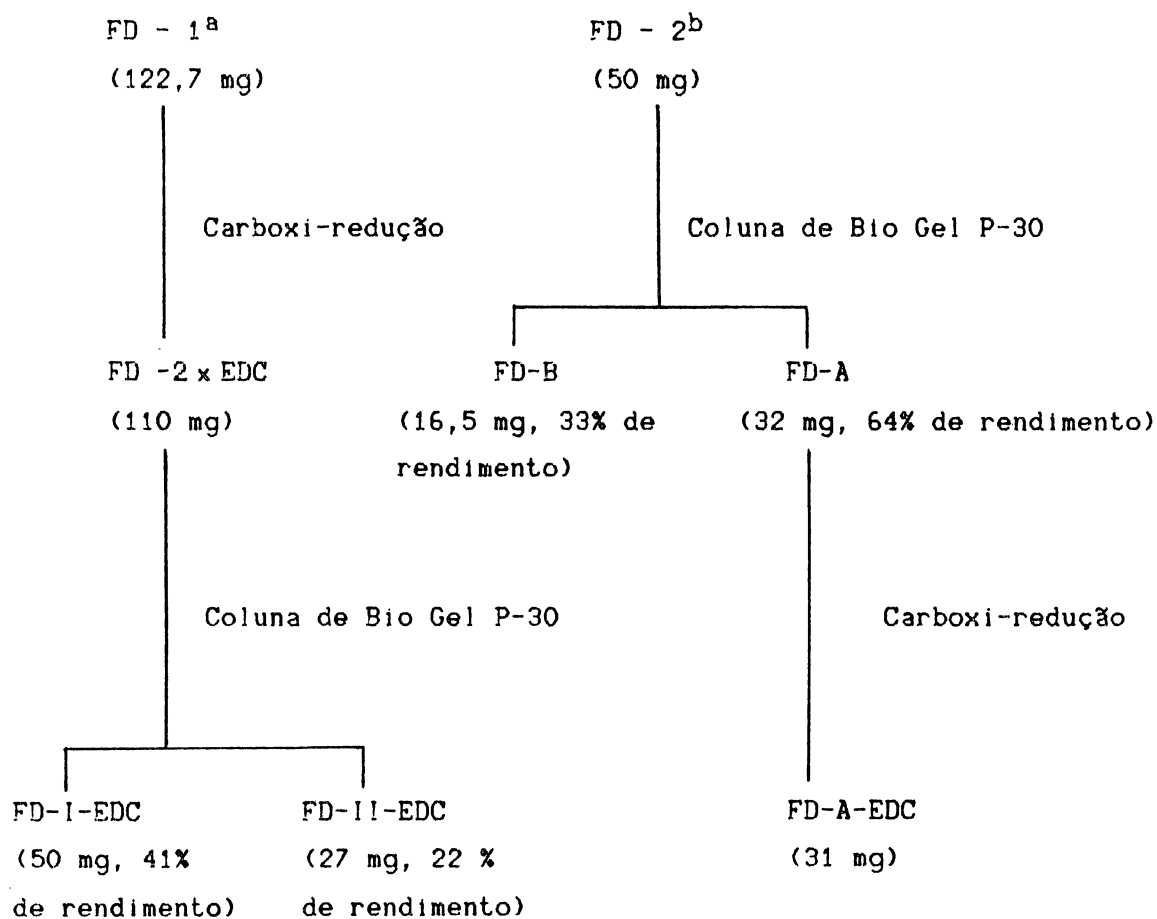


- a - c.f.g. em coluna capilar SP 2340 à 230°, na forma de acetatos de alditóis.
 A - Fração FD-1 obtida por hidrólise ácida parcial (H_2SO_4 0,05 M por 1h à 100°) da fucana F.P.
 B - Fração FD-1×EDC, obtida após a primeira carboxi-redução da FD-1.
 C - Fração FD-2×EDC, obtida após a segunda carboxi-redução da FD-1.
 D - Fração FD-1-EDC, obtida por fracionamento da fração FD-2×EDC em coluna de Bio-Gel P-30, (Col. 205°).
 E - Fração FD-11-EDC, obtida por fracionamento da fração FD-2×EDC em coluna de Bio-Gel P-30.

I - Fucitol, II - Xilitol, III - Manitol, IV - Galactitol, V - Glucitol

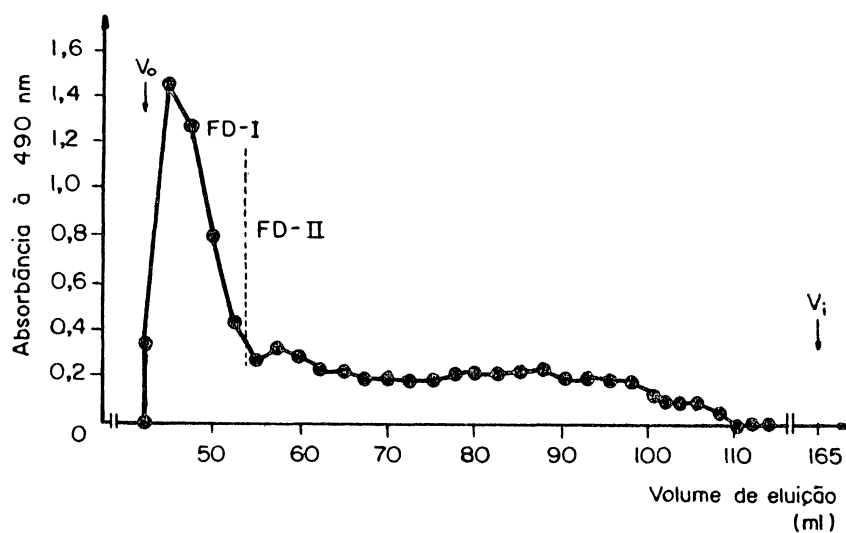
ESQUEMA D

CARBOXI-REDUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FD, OBTIDA APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA DE L. brasiliensis



- a. Obtida por hidrólise ácida parcial (H_2SO_4 0,05 M POR 1h à 100°) da fucana FP.
- b. Obtida por hidrólise ácida parcial, como em "a", da fucana F-075

FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DA FUCANA FD-2xEDC, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P.



- Cromatografia preparativa.

Bio-Gel P-30 (1,8X6 cm de d.i.).

Eluente: solução aquosa de NaCl 1M.

Frações de 2,6 ml.

Volume de eluição do azul de dextrana (V_0): 40 ml.

Volume de eluição do cloreto de cobalto (V_i): 165 ml.

TABELA XI - ANÁLISE POR c.f.g.^a DE OCTIL-GLICOSÍDEOS DA FRAÇÃO FD-1

FD-1 ^b	L-galactose ^c	D-galactose ^c
T ^d		
1,58 (P)	1,58 (P)	4,07 (G)
---	2,40 (M)	4,54 (G)
3,34 (M)	3,34 (M)	5,26 (P)
3,98 (M)	3,98 (M)	5,42 (M)
4,14 (G)	4,14 (G)	5,92 (P)
4,40 (P)	4,40 (P)	

a - c.f.g. em coluna capilar SP 2340 (190°, 20 min. → 205°, 3°/min)

b - Fração obtida por hidrólise ácida parcial (H₂SO₄ 0,05 M, 1h, 100°), da fucana FP; derivatizada com (-)-2-octanol (130° por 15h) e acetilada, de acordo com método descrito por LEONTEIN et al.⁵⁹

c - D- e L-galactose, derivatizadas com (-)-2-octanol, nas condições descritas em "b".

d - Tempo de retenção relativo ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil glucitol.

CHAVE - Percentagem das áreas dos picos: G - grande; M - médio; P - pequeno.

A possibilidade da heterofucana de L. brasiliensis ser uma associação não covalente de uma homofucana com outros heteropolímeros fica afastada em virtude dos vários heterofragmentos isolados dos produtos de hidrólise da fucana serem constituídos dos mesmos componentes do polímero original, embora em proporções variáveis. Deste modo a caracterização destes polímeros degradados é fundamental para o esclarecimento da estrutura do polissacarídeo original. Vale ressaltar que tais polímeros degradados formam de 17 - 18% (Esquema C) da fucana original, sendo portanto bastante representativos da porção heteropolimérica da molécula.

Os dados das tabelas X e XII demonstram que com exceção da fração FD-A (ausência de glucose e baixa proporção de ranminose), todos os polímeros degradados continham os mesmos componentes da fração original (FP).

A fração FP é altamente heterogênea constituída de polímeros correlacionados conforme foi demonstrado pelo fracionamento em coluna de DEAE-celulose, (F-025; F-050; F-075, F-100). Este fato é corroborado pela diferenciação que se observa nos polímeros degradados FD-I-EDC, (rico em manose) e FD-II-EDC, (rico em galactose).

A fração F-075 não foi dissociada em Bio-Gel P-100 e P-200 ou em Bio-Gel P-200 em presença de uréia, Figura 4. Devido ao caracter homogêneo de F-075 é provável que os polímeros degradados, FD-A e FD-B, embora distintos, sejam na realidade segmentos provenientes de uma única molécula.

TABELA XII - ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA FRAÇÃO DEGRADADA FD-2, POR c.f.g.^a

ACETATO DE ALDITOL	T ^b	F-075 ^c	FD-2 ^d	FD-A ^e	FD-B ^f	FD-A-2xEDC ^g
	%					
Ranminitol	0,28	0,0	0,0	1,2	0,0	0,6
Fucitol	0,30	63,1	14,0	2,3	1,0	4,0
Xilitol	0,54	4,0	3,0	21,7	51,0	8,1
Manitol	0,77	2,7	46,5	73,5	11,3	78,0
Galactitol	0,86	16,0	14,5	1,3	18,5	1,3
Glucitol	1,00	14,2	22,0	0,0	18,2	8,0

a - Análise por c.f.g. dos acetatos de alditóis, (SP 2340 à 220°).

b - Tempo de retenção relativo ao glucitol hexa-O-acetato.

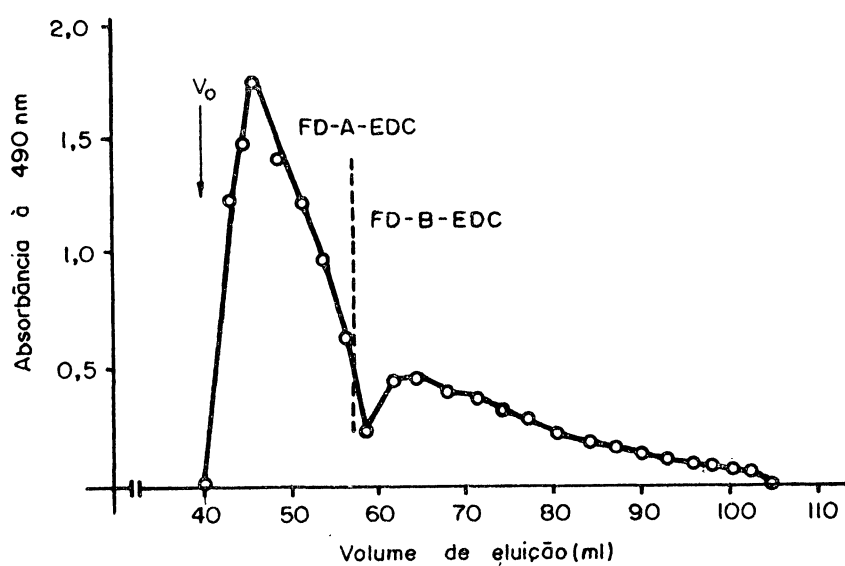
c - Fucana purificada por Cetavlon e fracionamento em DEAE-celulose, (Cl-).

d - Fração degradada de F-075.

e,f - Sub-frações de FD-2, obtidas por fracionamento em Bio-Gel P30.

g - Carboxi-redução de FD-A, segundo processo de TAYLOR & CONRAD¹¹⁹.

FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DA FUCANA FD-2, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F-075.



- Cromatografia preparativa.

Bio-Gel P-30 (1x65 cm de d.i.).

Eluente: solução aquosa de NaCl 1M.

Frações de 2,5 ml.

Volume de eluição do azul de dextrana (V_0): 40 ml.

Volume de eluição do cloreto de cobalto (V_1): 165 ml.

TABELA XIII - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR MÉDIO DAS FRAÇÕES FD^a.

FRAÇÕES	peso molecular-médio ^b	nº. de unidades
FD-1	4.767	30
FD-I-EDC	4.365	27
FD-II-EDC	2.378	15
FD-A	9.807	61
FD-B	4.888	31

a- FD, frações parcialmente degradadas, obtidas por hidrólise ácida parcial da fucana, segundo ANNO et al.⁴

FD-1, proveniente da fucana FP, (cetavlon).

FD-I-EDC e FD-II-EDC, frações, carboxi-reduzidas obtidas por fracionamento da FD-1 em coluna de Bio-Gel P-30.

FD-2, proveniente da fucana F-075 (DEAE-celulose).

FD-A e FD-B, obtidas da FD-2 por fracionamento em coluna de Bio-Gel P-30.

b- Determinado pelo método de PARK & JOHNSON⁸⁹ usando a fórmula:

$$PM = \frac{\text{peso de amostra (mg)} \times 160}{\text{mg de açúcar redutor}}$$

Fator 160 = peso molecular médio do anidro açúcar, (c.f.g.); exceto para FD-B (F=146).

MIAN & PERCIVAL⁷⁵ utilizaram seis processos sequenciados de extração de fucanas de alga parda, (H. lorea, B. bifurcata e P. pavonia) e isolaram fucanas que se diferenciavam no teor de fucose, ácido urônico e sulfato. Tal fato demonstra que a depender do processo de extração são obtidas fucanas com composição diferenciada e ainda que, a utilização de um único processo de extração não é suficiente para obtenção quantitativa destes polímeros. Além destes fatos, foi verificado que o processo de purificação da fucana de L. brasiliensis por base quaternária em presença de cálcio, como sugerido por ANNO et al.⁵ não permitiu a recuperação completa do polímero. Parte do polímero (50%) foi recuperado no sobrenadante o qual surpreendentemente apresentava composição distinta da fucana precipitada por cetavlon. Deste modo, e por acaso obteve-se um fracionamento da fucana em polímeros, ricos em manose e ricos em galactose. O teor de fucose era semelhante nas duas frações.

Os dados atuais não permitem o estabelecimento de um modelo estrutural para a fucana de L. brasiliensis. Entretanto os dados de metilação e de oxidação com periodato da fucana (F-075 e F-075-EDC), permitiram uma determinação estrutural parcial da porção de heterofucana correspondente às unidades de fucose.

A ausência de absorção na região de grupos hidroxílicos no espectro de I.V. da fucana metilada (HAWORTH⁴⁸ ou HAKOMORI⁴⁷) é compatível com um polímero completamente metilado.

Foi constatado (c.f.g.; alditol acetato), que o derivado 3-O-metil-fucitol aparece em alta percentagem, (65%) e em menor proporção 2,3-di-O-metil-fucitol, (17 %). Também foi

observado a presença de 3,4-di-O- e 2,3,4-tri-O-metil-fucitol (1,8 % de cada).

Aliando os fatos de que os grupos sulfato, na heterofucana de L. brasiliensis são estáveis a alcali, 3-O-metil fucitol é indicativo de unidades internas substituídas em C-2, com grupo sulfato em C-4.

Realmente, os dados de I.V., (absorção em 845 cm^{-1} , Figura 7), e o isolamento de fucose 4-sulfato (nos produtos de hidrólise parcial, Esquema C) bem como a alta percentagem de grupos sulfato, (axial' em conformação 1C_4) nesta molécula, são concordantes com a presença de grupos sulfato em C-4 e substituição em C-2.

O derivado 2,3-di-O-metil-fucitol é indicativo de grupos terminais não redutores sulfatado em C-4 e/ou de unidades internas com substituição glicosídica em C-4, o que está em acordo - em ambos os casos - com o consumo de periodato observado na fucana F-075, (Figura 13,14, Tabela XIV). Esta molécula também apresenta uma pequena percentagem, (1,8%) de grupos terminais não redutores, não sulfatados (2,3,4-tri-O-metil fucitol).

Unidades internas com ligação $1\rightarrow 4$ não podem ser excluídas nesta molécula em virtude da constatação do derivado 3,4-di-O-metil-fucitol, (1,8 %).

FIGURA 13 - CURVA DE OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO DE SÓDIO DA FUCANA F-075

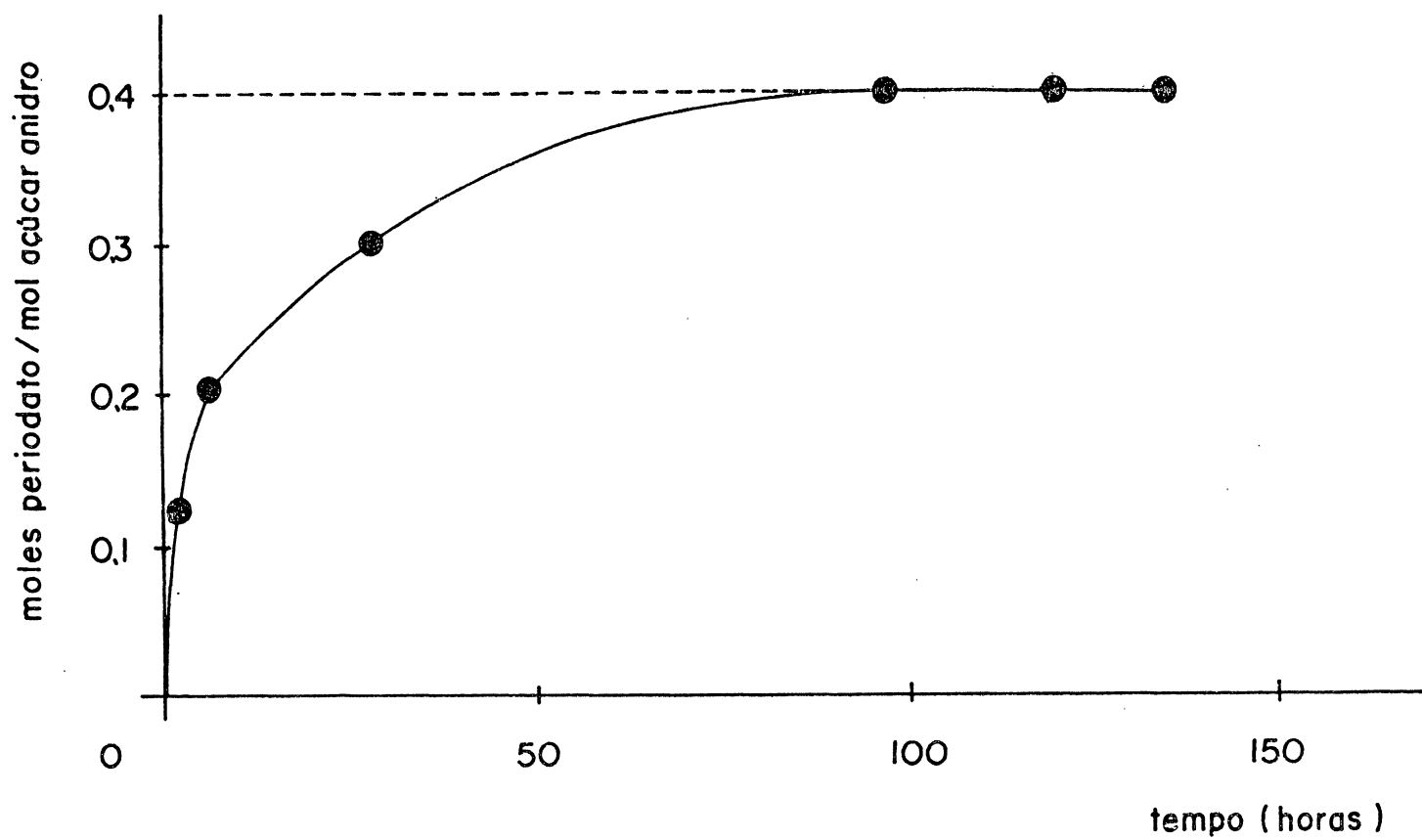
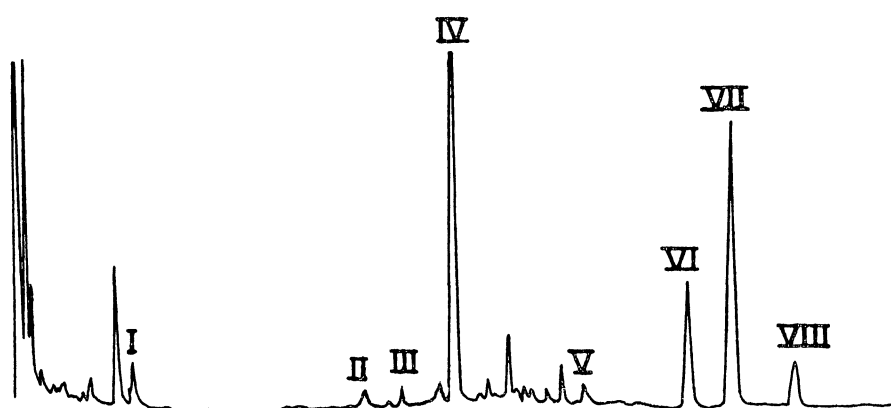


FIGURA 14 - ANÁLISE^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FUCANA F-075 OXIDADA COM META-PERIODATO DE SÓDIO.



a - Análise por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis (SP 2340 temperatura 150→200°; 3 graus/min)

- I - Etileno glicol
- II - Eritritol
- III - Treitol
- IV - Fucitol hexa- β -acetato
- V - Xilitol penta- β -acetato
- VI - Manitol hexa- β -acetato
- VII - Galactitol hexa- β -acetato
- VIII - Glucitol hexa- β -acetato

TABELA XIV - ANÁLISE POR c.f.g.^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FUCANA F-075 OXIDADA COM META-PERIODATO DE SÓDIO

Componentes	T ^b	%
Etileno glicol	0,17	1,8
Eritritol	0,46	1,2
Treitol	0,50	0,7
Fucitol penta- β -acetato	0,57	61,8
Xilitol penta- β -acetato	0,73	0,8
Manitol hexa- β -acetato	0,85	8,5
Galactitol hexa- β -acetato	0,91	21,1
Glucitol hexa- β -acetato	1,00	4,1

a- c.f.g. dos acetatos de alditóis, em coluna capilar SP2340 à temperatura de 150 \rightarrow 200°, 3 graus/minuto.

b- Tempos de retenção relativos ao do glucitol hexa- β -acetato.

O exame da fase aquosa do hidrolisado permitiu, após tratamento apropriado, o isolamento de fucitol livre. Excluindo a possibilidade de metilação incompleta, o fucitol pode ser proveniente de unidades internas di-sulfatada em C-3 e C-4 ou de unidades internas sulfatadas em C-4 e ramificadas em C-3 por unidades de fucose sulfatadas em C-4 ou ainda ser proveniente de pontos de ramificação.

Portanto, os dados de metilação fornecem uma indicação de cadeia principal formada de unidades de fucose com substituição majoritária em C-2, com grupos sulfato em C-4. Há também a indicação de ramificação em C-3 numa relação de ~1:4 relativo as unidades substituídas em C-2.

A rotação ótica da fucana F-075 é de $-77,2$, (Tabela VIII) e o isolamento de fucobiosil (substituído em C-2 e sulfatado em C-4) indicam ligação glicosídica do tipo alfa $1 \rightarrow 2$. Este dado é suportado por espectrometria de carbono-13 da fucana F-075 (δ 99,9 na região de C-1).

Esta estrutura é compátivel com os dados de oxidação com periodato da fucana, em que, observou-se uma recuperação quase total das unidades de fucose no polímero oxidado (Tabela XIV).

A pequena percentagem, (Degradação tipo Smith), de treitol, (0,7 %) e eritritol (1,2 %), deve originar-se da porção heteropolimérica, (outras unidades monossacarídicas excluindo-se a fucose).

Os dados de metilação de porção heteropolimérica da fucana, (formada por manose, galactose, glucose, xilose e ácidos urônicos) não foram muito esclarecedores em virtude da complexidade da molécula.

Entretanto, no polímero degradado (FD-A-2xEDC), rico em manose (78 %; Tabela XII), foi demonstrado por metilação que tais unidades formam uma cadeia linear substituída em C-4, (2,3,6-tri-O-metil-manitol). A oxidação com periodato, levando à formação de eritritol está de acordo com os dados de metilação. Na fração FD-A-2xEDC a fucose, galactose, glucose (este último monossacarídeo proveniente da carboxi-redução do ácido glucurônico), não foram susceptíveis à oxidação com periodato. Deste modo o glicerol gerado no processo oxidativo deve resultar de manose (substituída em C-6) e em menor proporção da xilose (substituída em C-4 ou C-2). A glucose resultante da carboxi-redução do ácido urônico, não sendo oxidada sugere substituição, pelo menos, em C-3 do ácido glucurônico.

Vale ressaltar que o segmento de manose no polímero original, (F-075, Tabela XV) não foi susceptível à oxidação com periodato, como ocorre no polímero degradado. Tal fato sugere que o segmento de manose apresenta substituição por cadeias de fucose no polímero original. Esta suposição esta baseada no fato de que durante o processo degradativo da fucana (hidrólise parcial) quase toda fucose foi removida, (na fração FN, 85 % de fucose livre, e na fração FA). Tabela IX e XV, e Esquema C .

TABELA XV - ANÁLISE COMPARATIVA DA FUCANA (F-075) E DA FRAÇÃO DEGRADADA (FD-2xEDC) APÓS OXIDAÇÃO COM META-PERÍODATO DE SÓDIO

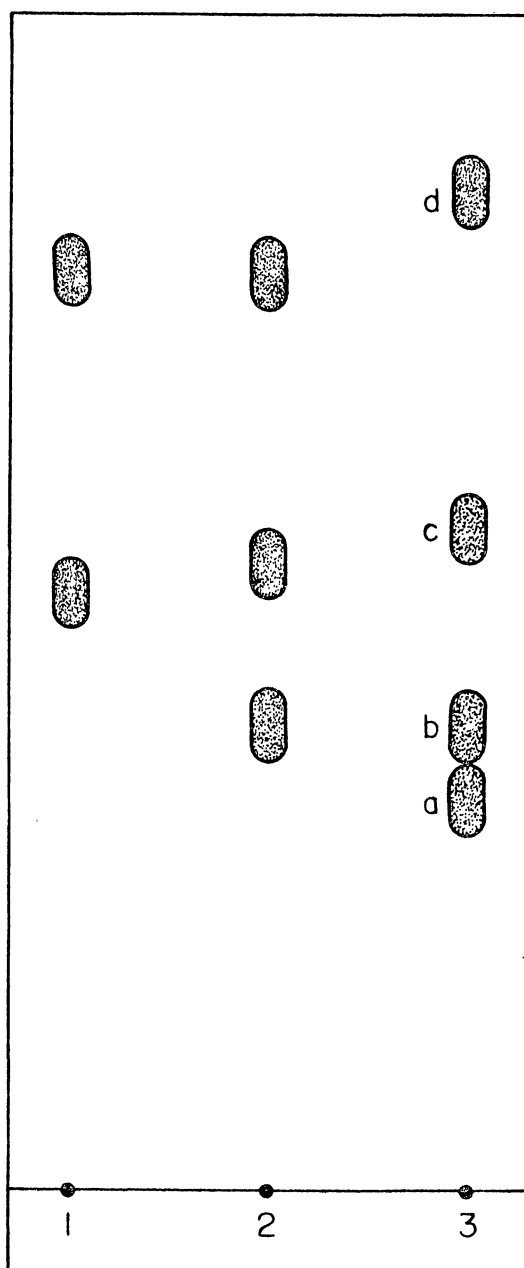
DERIVADO	F-075 ^a	F-075 ^b	FD-A-2xEDC ^c	FD-A-2xEDC ^b
%				
Etilenoglicol	0,0	1,8	0,0	0,0
Glicerol	0,0	0,0	0,0	26,3
Eritritol	0,0	1,2	0,0	23,5
Treitol	0,0	0,7	0,0	0,0
Raminitol	0,0	0,0	0,6	3,5
Fucitol	63,1	61,8	4,0	3,1
Xilitol	4,0	0,8	8,1	3,6
Manitol	2,7	8,5	78,0	2,5
Galactitol	16,0	21,1	1,3	23,1
Glucitol	14,2	4,1	8,0	14,6

a - Fucana purificada em coluna de DEAE-celulose

b - Após oxidação com meta-periodato de sódio.

c - Obtida de F-075 após hidrólise parcial, fracionamento em coluna de Bio-Gel P-30 e carboxi-redução, (TAYLOR & CONRAD¹¹⁹).

FIGURA 15 - ANÁLISE POR c.p. ASCENDENTE DA FRAÇÃO FD-1, OBTIDA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FUCANA F.P.



Fase móvel: C, Visualizador: I e II, Tempo de corrida: 40 horas

- 1 - Fração FD-1 hidrolisada, (TFA 1N, 3h, 100°).
- 2 - Fração FD-1 hidrolisada, (TFA 0,5N, 20h, 100°).
- 3 - Padrões: a - ácido galacturônico, b - ácido glucurônico, c - galactose, d - fucose

Estes dados não permitem o estabelecimento de uma estrutura definitiva para este polímero, mas sugerem que são formados principalmente por uma cadeia de manose com provável alternância de ligações 1→4 e 1→6 e apresentando no polímero original cadeias laterais de xilose e fucose. Estudos mais detalhados necessitam ser realizados neste polímero degradado afim de esclarecer o posicionamento das unidades de ácido glucurônico nesta molécula. Os resultados obtidos para a fração FD-1-EDC (metilação) são muito semelhantes aos da fração FD-A-2×EDC.

Embora a estrutura básica da porção homopolimérica (relativo as unidades de fucose) seja comum à maioria das fucanas, a parte heteropolimérica desta molécula apresenta grande diversidade estrutural, com arranjo molecular diferenciado em quase todas as fucanas isoladas de Phaeophytas.

Embora existam duas espécies de Laminarias no Brasil, (L. brasiliensis (Joly & Oliveira) e L. abyssalis (Joly & Oliveira)), no presente trabalho foi investigada a estrutura do alginato de L. brasiliensis, coletada no litoral do Estado do Espírito Santo (Brasil) na profundidade de ~20 metros no mês de abril de 1983.

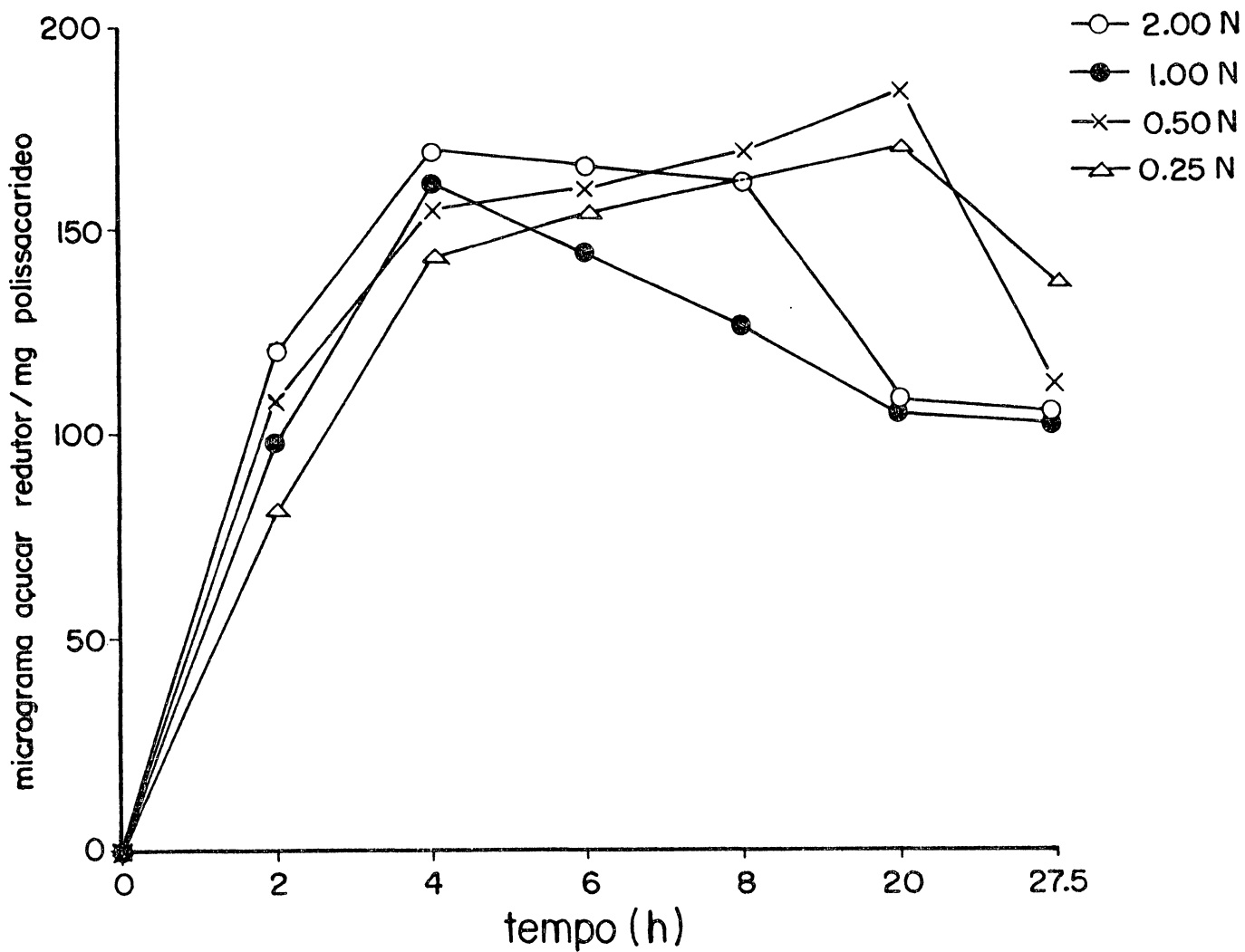
O alginato extraído em meio alcalino (Esquema A), foi obtido na forma de ácido algínico por tratamento com ácido clorídrico, sendo este o esquema comumente utilizado para a extração de ácido algínico, (rendimento de 24,8% em peso seco relativo ao pó cetônico, Esquema A e B).

Para os estudos estruturais o poliurônideo foi repurificado por complexação com base quaternária, (cetavlon) e descomplexação com solução de cloreto de sódio, (rendimento de ~18%). O alginato obtido, livre de grupo sulfato e de proteína apresentava rotação ótica específica de $-104,2$ (c, 0,28 água) e um equivalente grama de 216, Tabela XXII.

Embora a hidrólise ácida seja um processo comumente empregado para a determinação da composição do ácido algínico, não é entretanto um método apropriado para estabelecer a proporção das unidades formadoras deste polímero, em virtude do baixo rendimento em ácido urônico livre. O melhor rendimento em ácidos urônicos do alginato de L. brasiliensis foi de 40%, o qual não está corrigido pelo fator de correção introduzido por Haug et al.³³, de 0,66, para compensar a preferencial degradação do ácido gulurônico.

A presença do ácido manurônico e gulurônico foi indicada por eletroforese¹⁵ do hidrolisado obtido por tratamento com T.F.A. 72% (por 18 h, 2-4°) seguido de diluição do ácido para 0,5 M (por 20h à 100°). Entretanto nestas condições apenas 40% do total de ácido urônico foi obtido como indicado pelo método de carbazol¹² e do fenol ácido sulfúrico²¹. Tal fato observa-se devido a alta resistência a hidrólise das ligações glicosidurônicas, aliado ao fato de que o ácido gulurônico é degradado à uma velocidade muito maior que o ácido manurônico³³. Tal fato explica o valor superestimado para a relação M/G do ácido algínico de L. brasiliensis quando utilizado o processo de complexação com sais de brucina dos produtos de hidrólise ácida, de acordo com processo descrito por SIDDIQUI¹⁰⁹.

FIGURA 16 - CURVA DE HIDRÓLISE^a DO ACIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis COM ACIDO TRIFLUORACÉTICO.



a - Determinada à 100°, acompanhamento da hidrólise pelo aparecimento de açúcar redutor, (SOMOGYI-NELSON)¹¹².

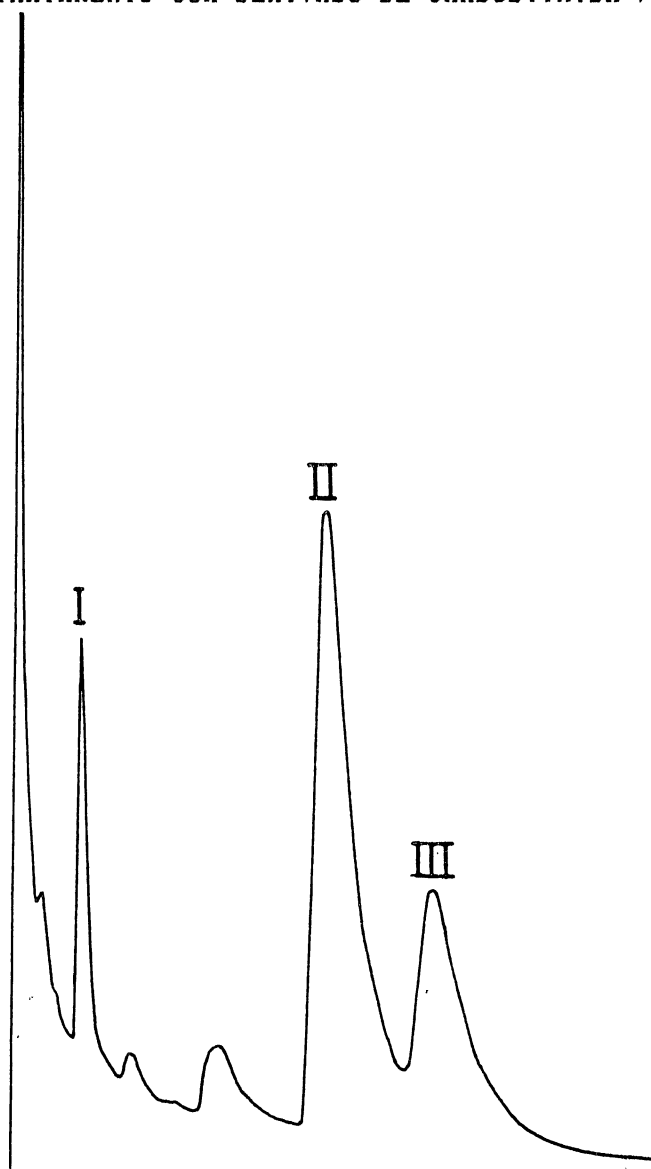
Um método alternativo para a determinação da relação de ácido β -D-manurônico e α -L-gulurônico, (relação M/G), foi a carboxi-redução do ácido algínico utilizando-se dois processos distintos.

A redução dos grupos carboxílicos do ácido algínico por esterificação com derivado de carbodiimida¹¹⁹ seguido de redução do carboxi-ester com boridreto de sódio, forneceu um rendimento de 80% e carboxi-redução de 86% (titulação). O outro processo de carboxi-redução, envolveu a esterificação prévia com óxido de propileno e redução como no processo anterior, (rendimento de 85% e carboxi-redução de 75%, titulação). Figura 17 e 18, Tabela XVI e XVII.

Tentativas em aumentar a percentagem de carboxi-redução por tratamentos subsequentes não foram alcançados. Por tratamento com óxido de propileno observou-se uma alteração na relação M/G. este fato não está bem esclarecido e deverá ser estudado posteriormente, Figura 18, Tabela XVIII.

A análise por cromatografia em fase gasosa (acetato de alditol) da gulomanana forneceu três componentes que foram identificados como 1,6-anidro- β -L-gulose (14 %), manitol (55 %) e glucitol (31 %), Figura 17 e 20-A, Tabela XVI.

FIGURA 17 - ANÁLISE POR c.f.g.^a DO ÁCIDO ALGÍNICO APÓS CARBOXI-REDUÇÃO, POR TRATAMENTO COM DERIVADO DE CARBODIIMIDA / NaBH₄^b



a - c.f.g. dos acetatos de alditóis em coluna OV 225 à 205°.

b - Esterificação com carbodiimida, (EDC), seguido de redução do ester com NaBH₄, segundo TAYLOR & CONRAD¹¹⁹.

- I - 1,6-anidro β -L-tri-D-acetil-gulose
- II - manitol hexa-D-acetato
- III - glucitol hexa-D-acetato

TABELA XVI - ANÁLISE POR c.f.g.^a DO ALGINATO CARBOXI-REDUZIDO POR TRATAMENTO COM DERIVADO DE CARBODIIMIDA E NaBH₄

Componente	T ^c	% ^d
1,6-anidro β -L-tri-O-acetil-gulose	0.19	13.9
manitol hexa-O-acetato	0.86	55.1
glucitol hexa-O-acetato	1.16	31.0

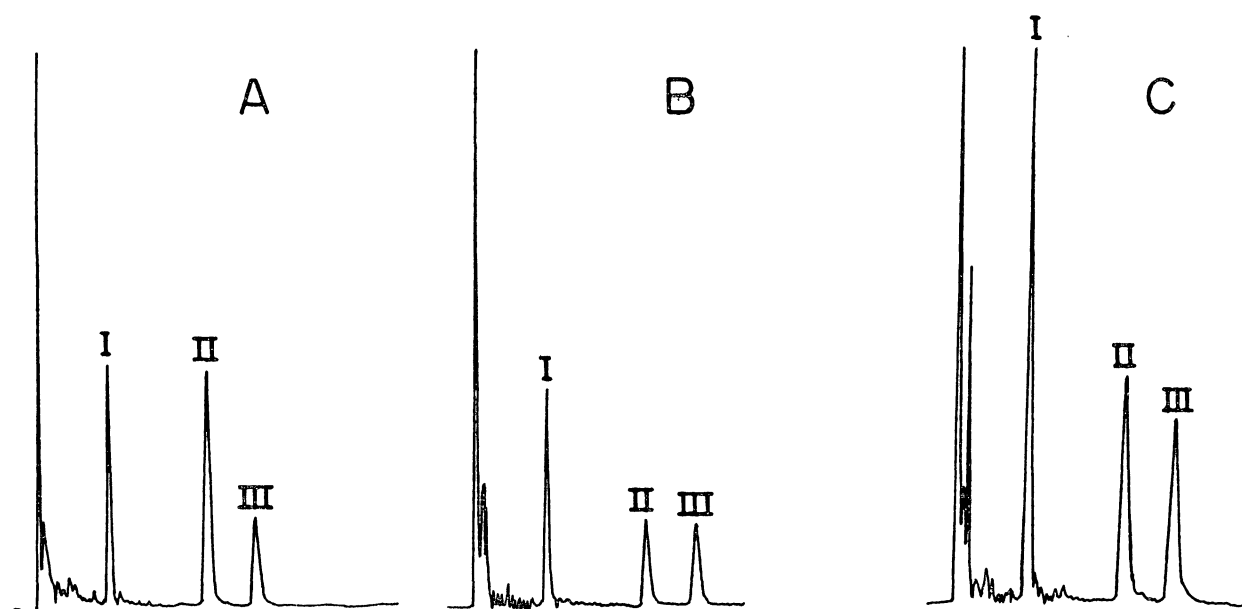
a - c.f.g. em coluna OV 225 à 205°.

b - Segundo processo de TAYLOR e CONRAD¹¹⁹.

c - Tempo de retenção relativo ao galactitol-hexa-O-acetato.

d - Percentagem de cada componente; a relação M/G foi de 1,2:1.

FIGURA 10 - ANÁLISE POR c.f.g.^a DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis, CARBOXI-REDUZIDO, POR TRATAMENTO COM ÓXIDO DE PROPILENO/ NaBH₄^b



a - c.f.g. em coluna capilar SP 2340 à 230°.

b - Carboxi-redução segundo DEVEL¹⁹ e ASPINALL & CANAS-RODRIGUES⁷.

A,B,C - Ácido algínico após o primeiro, segundo e terceiro tratamento como em "b", respectivamente.

I - 1,6-anidro β -L-tri-D-acetil-gulose

II - manitol hexa-D-acetato

III - glucitol hexa-D-acetato

TABELA XVII - ANÁLISE POR c.f.g.^a DO ALGINATO CARBOXI-REDUZIDO POR TRATAMENTO COM ÓXIDO DE PROPILENO / NaBH₄^b

Componente	T ^c	A-1-OP ^d	A-2-OP ^d	A-3-OP ^d
		%		
1,6-anidro β-L-tri-β-acetil-gulose	0.34	26.8	40.0	39.7
manitol hexa-β-acetato	0.77	51.0	28.6	30.7
glucitol hexa-β-acetato	1.00	22.2	31.0	29.6

a - c.f.g. dos acetatos de alditóis, em coluna capilar SP 2340 à 230°.

b - Tratamento do ácido algínico com o agente esterificante óxido de propileno, segundo DEUEL¹⁹, e redução do correspondente ester com NaBH₄ segundo ASPINALL & CANAS-RODRIGUES⁷.

c - Tempo de retenção relativo ao glucitol-hexa-β-acetato.

d - Correspondem ao ácido algínico de L. brasiliensis após o primeiro (A-1-OP), segundo (A-2-OP) e terceiro (A-3-OP), tratamento como em "a".

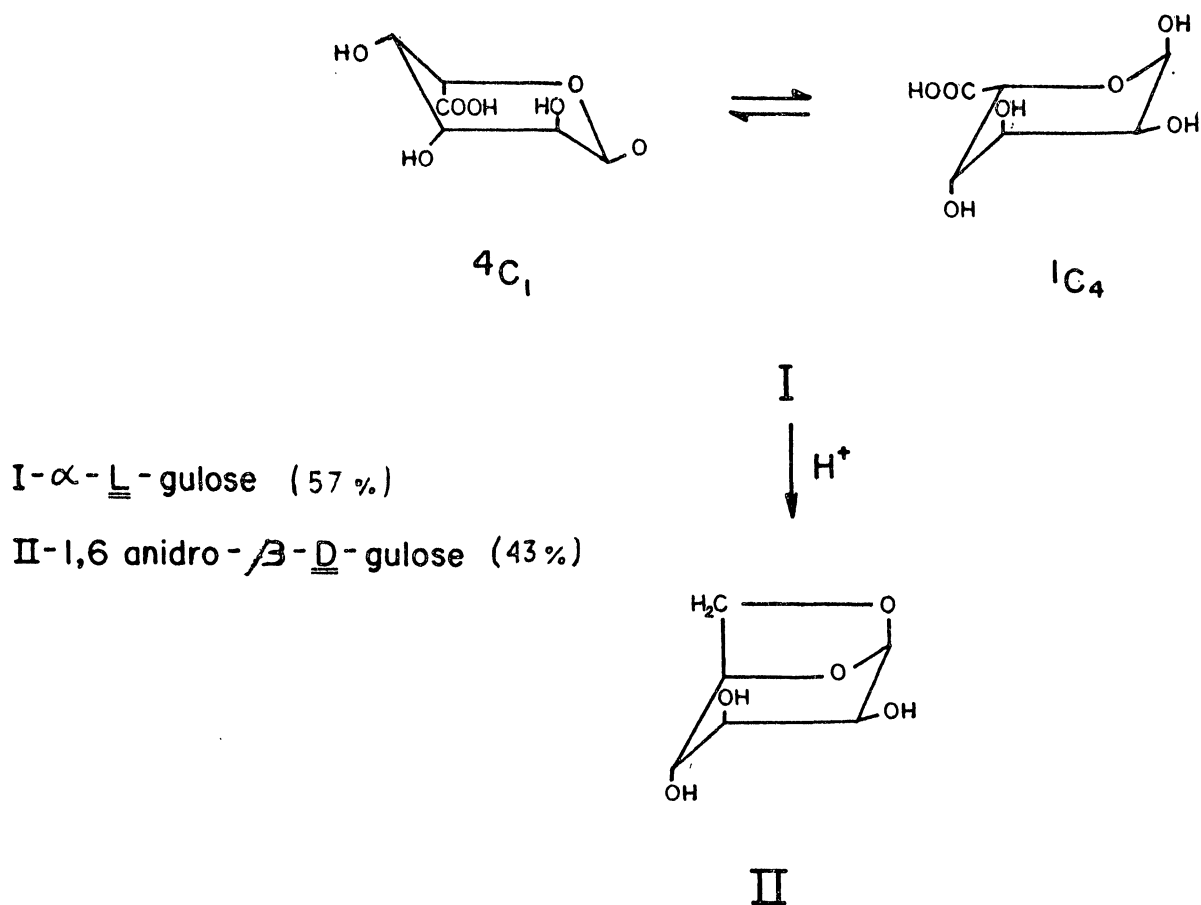
TABELA XVIII - CARBOXI-REDUÇÃO^a DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis

FRAÇÃO ^b	RELAÇÃO MOLAR ^c	RENDIMENTO ^d (%)	μ red ^e
A	----	-----	11.7
A-1-OP	1:1	86.5	4.4
A-2-OP	04:1	60.0	2.5
A-3-OP	0,4:1	50.0	2.5

- a. Carboxi-redução do ácido algínico por sucessivos tratamentos com óxido de propileno/ NaBH_4 segundo DEUEL¹⁹ e ASPINALL & CANAS-RODRIGUES⁷.
- b. Frações de: A = alginato de L. brasiliensis submetido ao primeiro (A-1-OP), segundo (A-2-OP) e terceiro (A-3-OP) tratamento como em "a".
- c. Relação das áreas de manitol/glucitol + 1,6 anidro- β - L -gulose, por c.f.g. (alditol acetato).
- d. Rendimento em relação ao ácido algínico "A".
- e. Viscosidade reduzida à 25°.

FIGURA 19 - EQUÍLIBRIO ÁCIDO DA GULOSE.

Gulose(I) em condições ácidas¹¹⁵ entra em equilíbrio com seu correspondente anidro-açúcar (II).



A presença de 1,6-anidro-gulose nos produtos de hidrólise da gulomanana foi confirmada por espectroscopia de massa (Figura 20-A e 20-B) utilizando-se padrão de 1,6-anidro talose deuterada (Figura 20-C). Fragmentos, m/e da amostra: 243, 229, 228, 186, 168, 139, 127, 126, 97; Figura 21.

Estes dados estão de acordo com os de HEYS & SCHARMANN⁴².

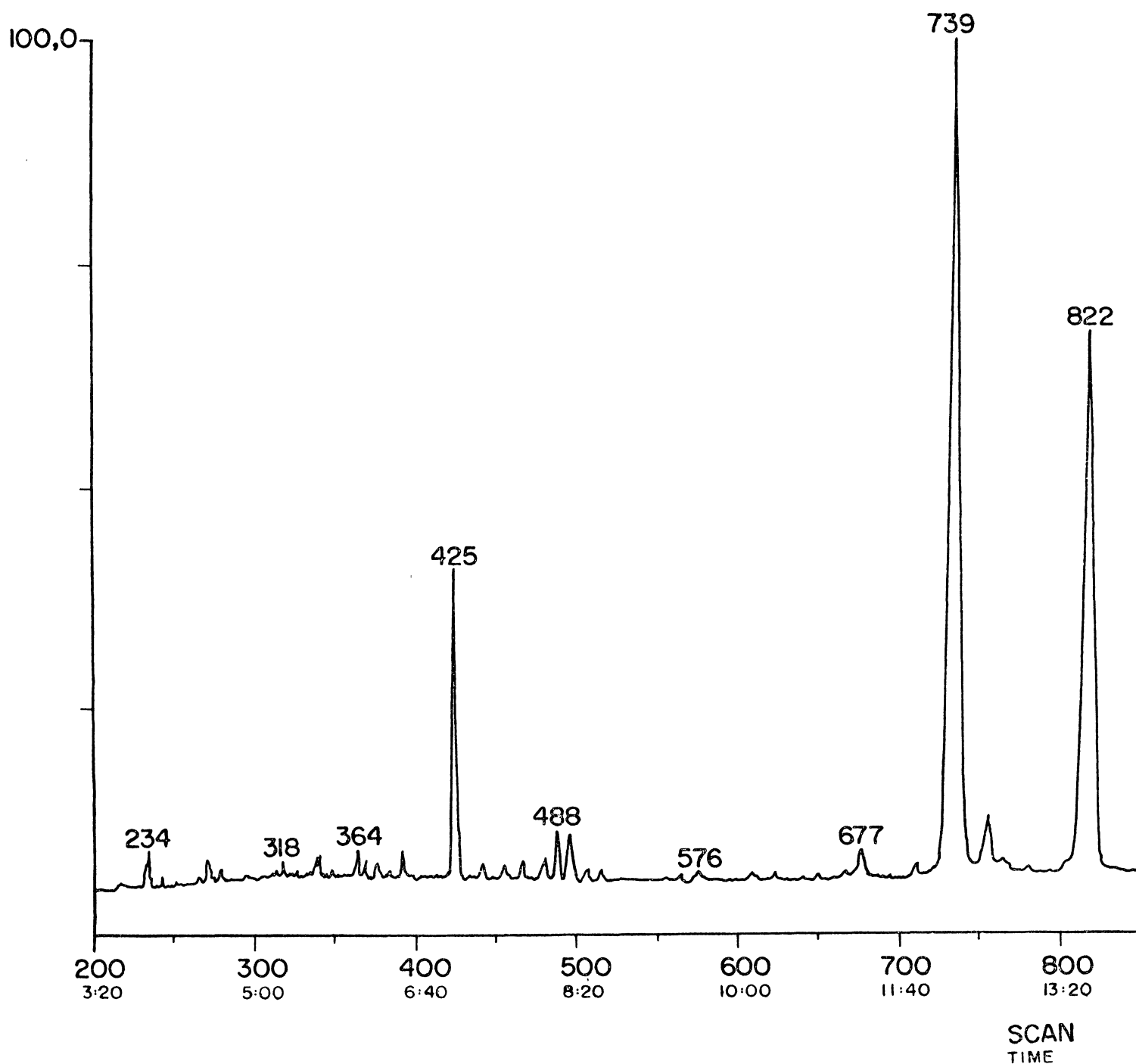
A determinação da relação M/G da gulomanana pelos dois processos de carboxi-redução são concordantes, sendo de 1,22:1 pelo processo via esterificação com EDC e de 1:1 pela esterificação com óxido de propileno, (Figura 1 e 18, Tabela XVI e XVII). Tal relação é inexplicavelmente diferente de 0,5:1 obtida para o alginato de L. brasiliensis por NISHIDA et al.⁸¹. Esta relação não deve ser considerada como real, em virtude de ter sido obtida por processo hidrolítico³³.

O valor da relação M/G do ácido algínico de L. brasiliensis determinada no presente trabalho situa-se intermediariamente entre os valores obtidos para o ácido algínico de L. hyperborea (0,21:1) e L. digitata (3,66:1). Tabela II.

Variações sazonais acentuadas no teor de ácido algínico tem sido observadas em algas de águas frias. Trabalhos correlatos, realizados em alginato de Sargassum cymosum (coletada no litoral do Paraná, Caiobá, durante 12 meses) não demonstraram variações apreciáveis no teor deste poliurônideo (28,6 - 31,9 % em peso seco relativo ao pó cetônico). Tal estudo não foi realizado em L. brasiliensis.

ESPECTROSCOPIA DE MASSA DO DERIVADO 1,6-anidro β -D-gulose
OBTIDO APÓS HIDRÓLISE DO ACIDO ALGÍNICO CARBOXI-REDUZIDO.

FIGURA 20-A - CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE (T.F.A. 1 N A 100% POR 8
h) - ALDITOL ACETATO.



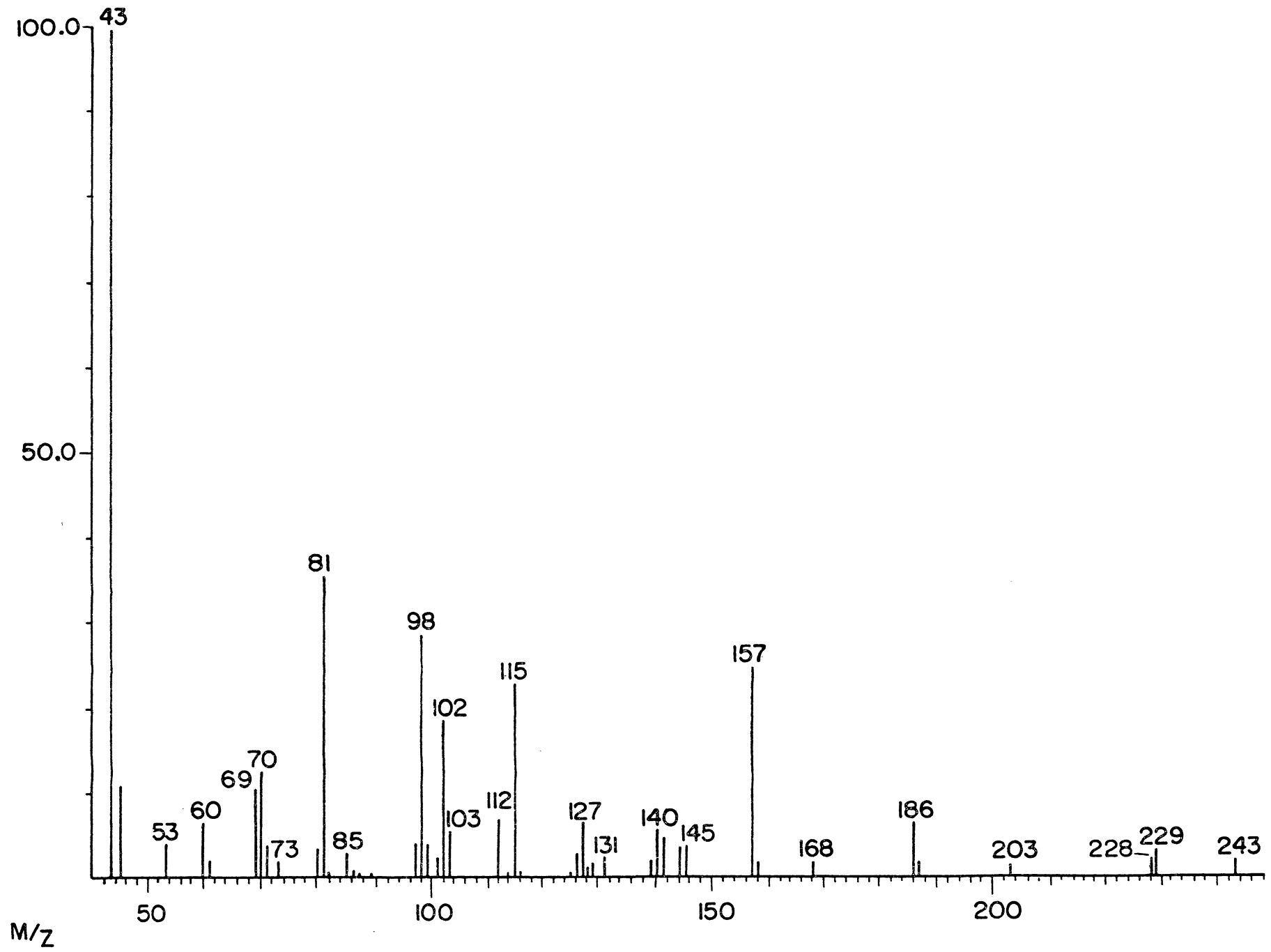


FIGURA 20-B - ESPECTRO DE MASSA DO DERIVADO 1,6-anidro-gulose.

FIGURA 20-C - ESPECTRO DE MASSA DO DERIVADO 1,6-anidro-talose deuterada.

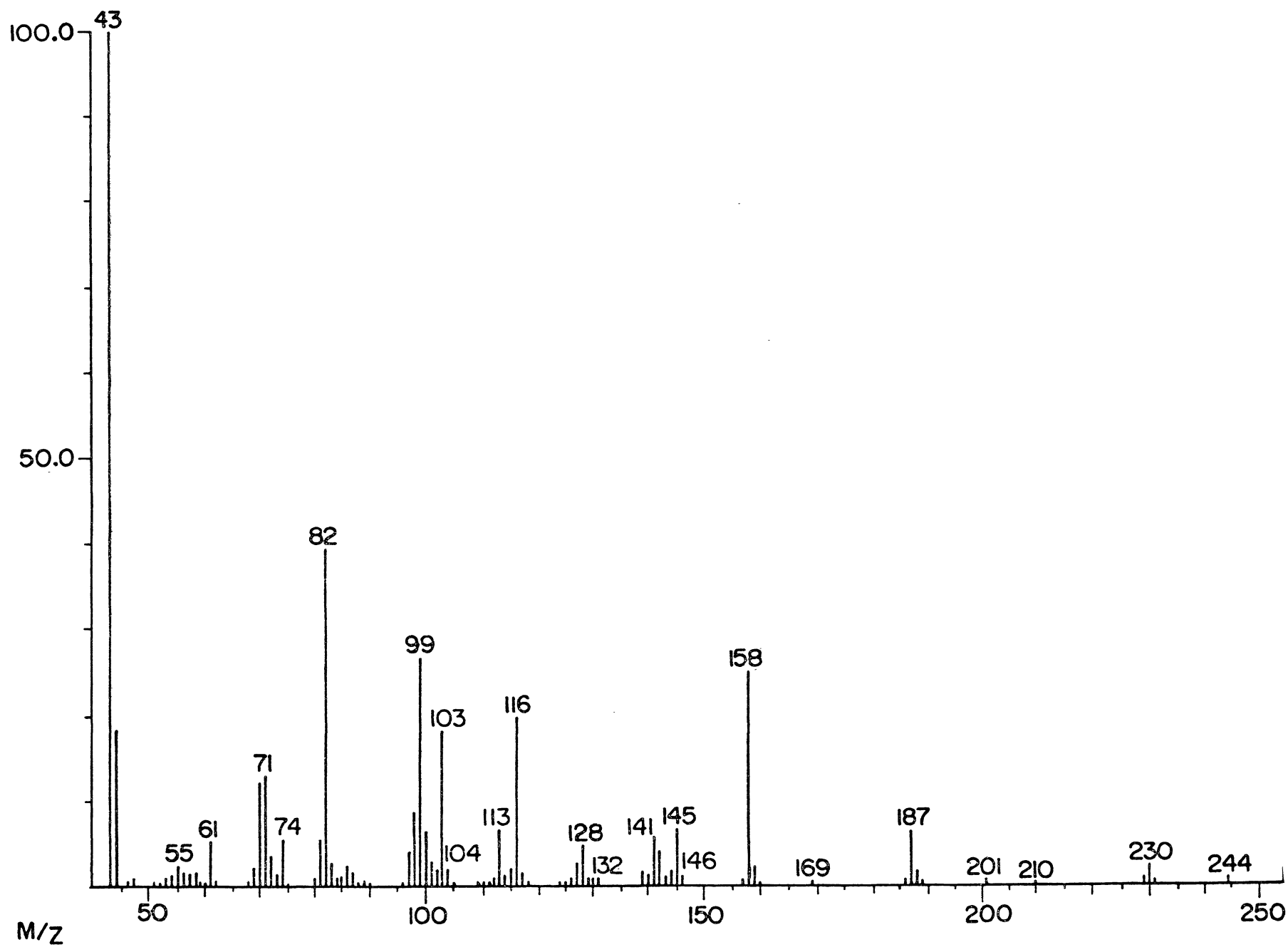
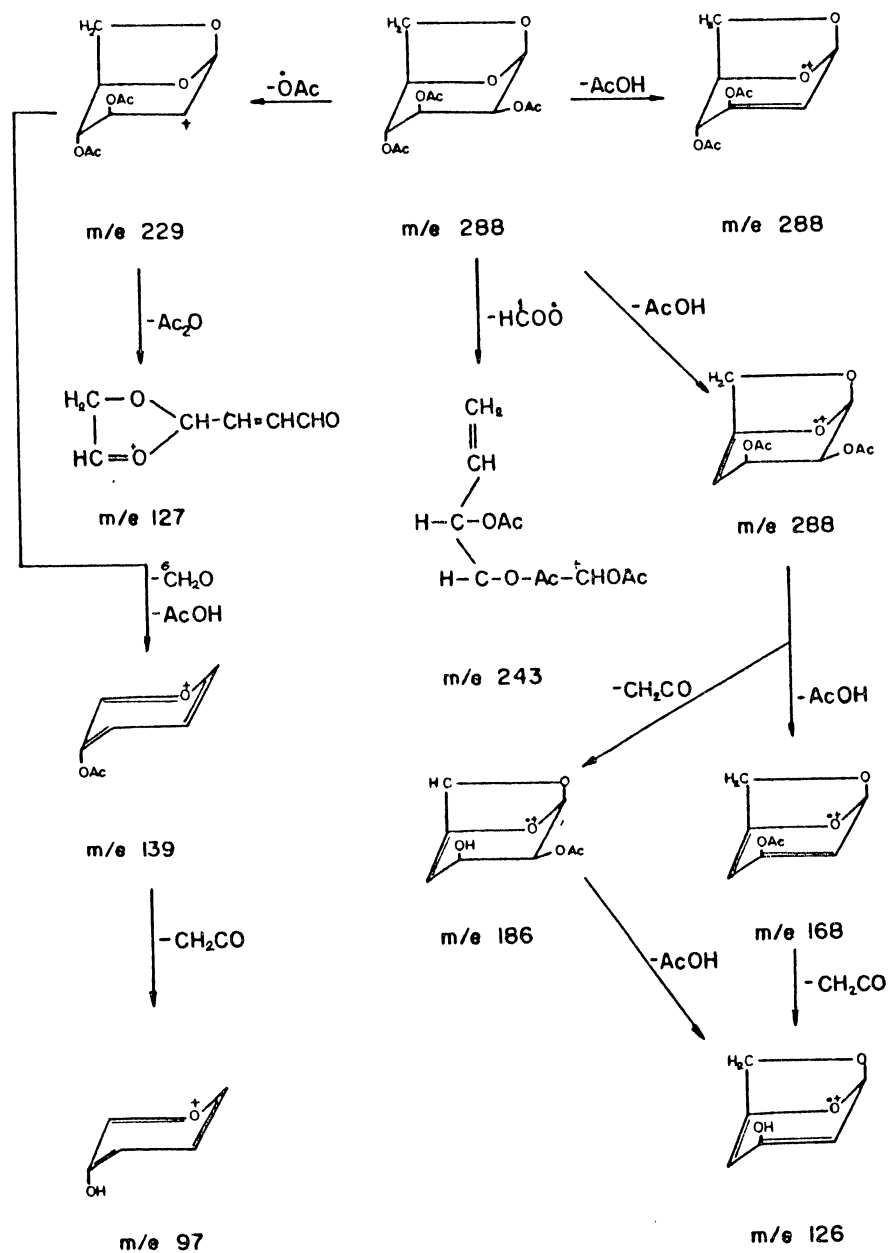


FIGURA 21 - ALGUNS DOS FRAGMENTOS DO 1,6-anidro- β -L-gulose, OBTIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE MASSA



- a. Baseado em mecanismo proposto para 1,6-anidro-D-idose por HEYNS & SCHARMANN⁴².
- b. Impacto de elétrons.

O espectro de r.m.n.- ^{13}C do alginato de sódio de L. brasiliensis, (Figura 22) contém "multipletes" na região do carbono anomérico. Segundo GRASDALEN et al.²⁹ esses "multipletes" refletem a sequência das unidades (M e G) e são sensíveis a natureza da unidade vizinha M ou G, baseado na constante de acoplamento $^1J [^{13}\text{CH}(1)]$ do bloco de manuronato (90% de pureza) de Ascophyllum nodosum. Os sinais dos dois "dupletes" foram atribuídos a sequência, (de campo baixo para campo alto), MG, GG, MM e GM. Como polímero de L. brasiliensis não foi parcialmente degradado, não foram assinalados os sinais na região de campo mais alto.

A gulomanana obtida pela carboxi-redução (via E.D.C.) do ácido algínico de L. brasiliensis, forneceu por r.m.n.- ^{13}C um sinal na região de C-1 correspondente as unidades de manopiranosil a δ 100,42 e outro das unidades de gulopiranosil a δ 101,35. Estes sinais foram assinalados pela determinação da constante de acoplamento, sendo o valor de 158 Hz correspondente à ligação β -glicosídica, e o de 174 Hz à ligação α -glicosídica, (Figura 23).

Para o isolamento dos blocos M e G, o alginato de L. brasiliensis foi submetido a dois tratamentos sucessivos com ácido oxálico 1M por 20h à 100°C, de acordo com o método de Haug et al.³⁸. Nestas condições foram obtidas duas frações: uma fração hidrolisável, (FH) e outra fração resistente à hidrólise (R-1). A fração R-1 foi previamente dialisada, e em pH 2,85 forneceu as subfrações solúvel, (S-2) e insolúvel, (R-2) os quais originaram, (após diálise e tratamento com cetavlon), os blocos M, (FS) e os

FIGURA 22 - ESPECTROS DE r.m.n.- ^{13}C DO ACIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis, OBTIDO A 360 MHz EN RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ^1H , NA TEMPERATURA DE 33°, EM D_2O .

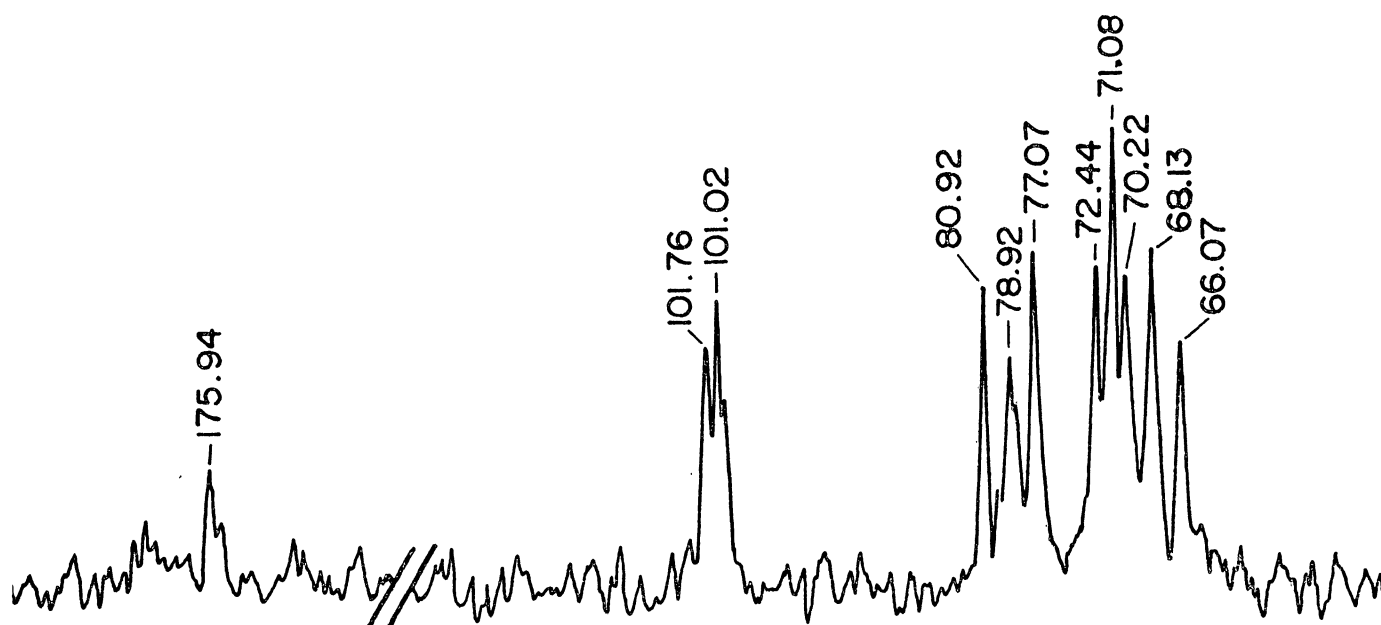
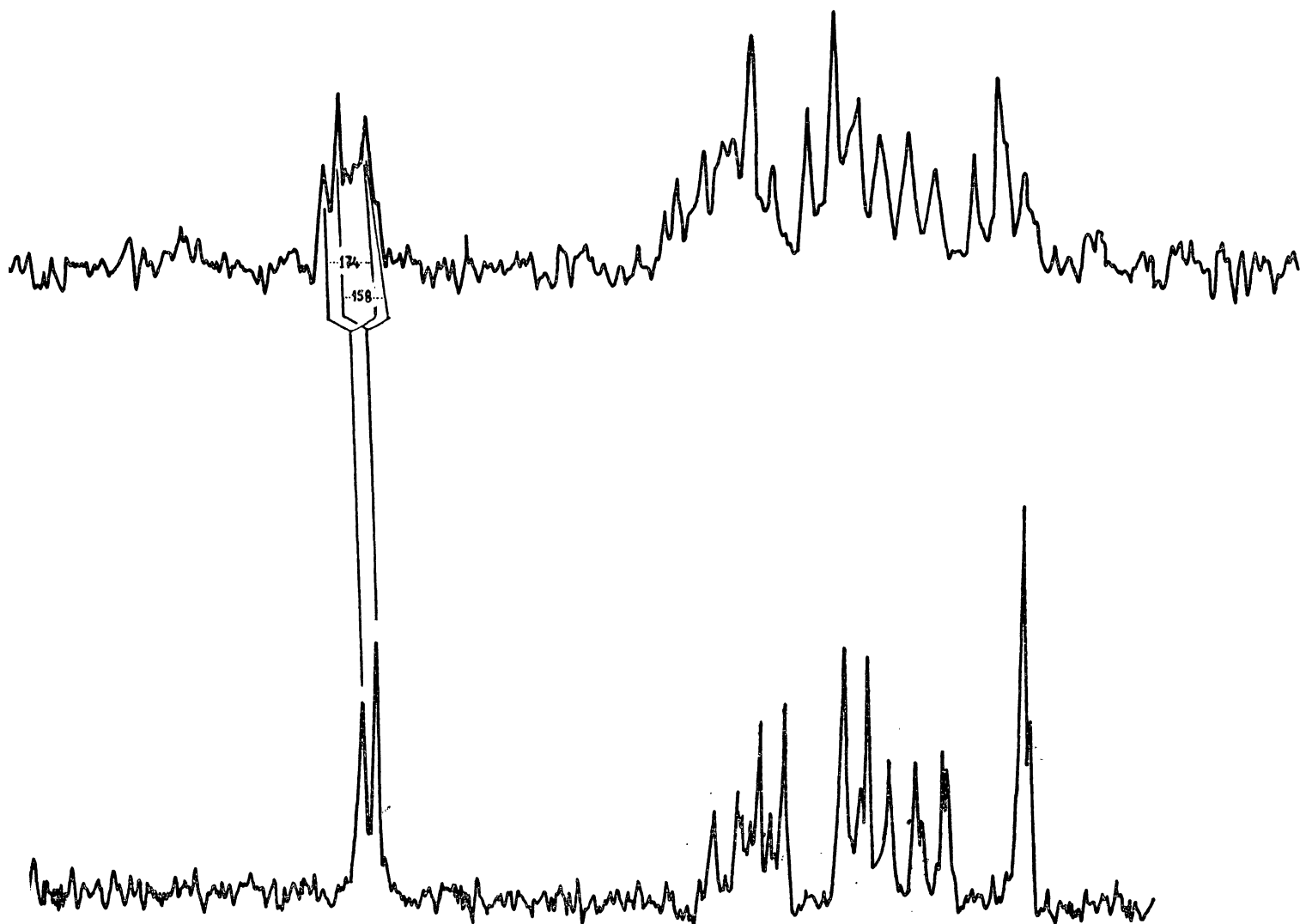


FIGURA 23 - ESPECTROS DE r.m.n.- ^{13}C DO ACIDO ALGÍNICO CARBOXI-REDUZIDO, DE L. brasiliensis, OBTIDO A 360 MHz EN RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ^1H , NA TEMPERATURA DE 33° , EM D_2O .



blocos G, (F1). Esquema E. Os rendimentos destas frações estão na Tabela XIX.

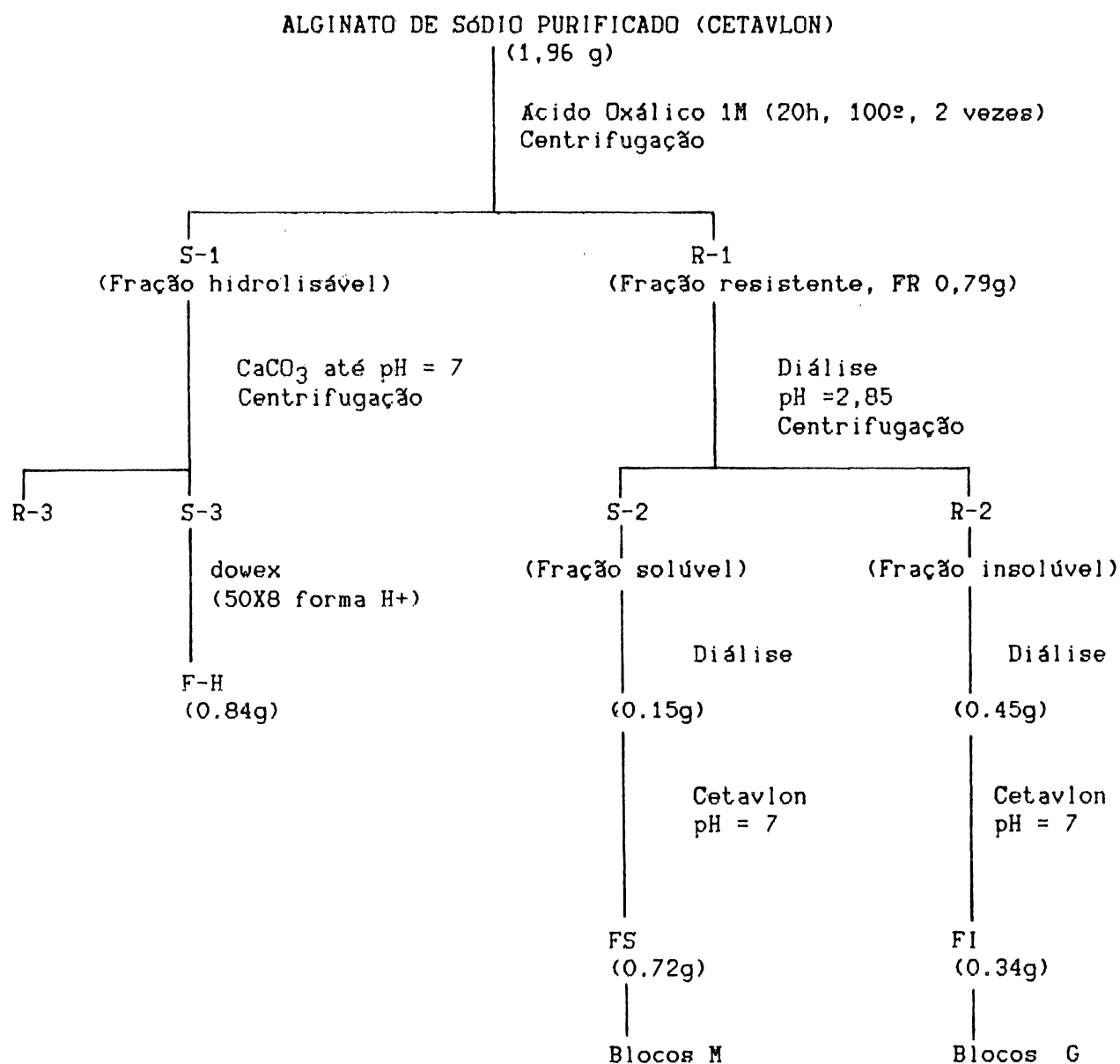
O bloco M, ($[\alpha]_D-80$) com um rendimento inferior (6 %) ao do bloco G (17 %; $[\alpha]_D-114$) apresentou entretanto um grau de polimerização de 26, superior do bloco G, (g.p. 16) Tabela XX e XXI. Estes valores de g.p. obtidos pelo método do ferriciamento (Park e Johnson)⁸⁹ aproxima-se daquele obtido por r.m.n.-¹³C.

Análise de r.m.n.-¹³C destas frações indicou que nenhuma impureza que não carboidrato estava presente, e que consistiam respectivamente de blocos M, e blocos G.³¹

O espectro de r.m.n.-¹³C do bloco G não mostrou sinais provenientes de unidades de ácido manopiranosidurônico, no qual a relação sinal/ruído do espectro foi de 80, indicando que menos de 2% desta unidade estava presente. As áreas relativas dos sinais de C-1 a δ 101,76 (unidades ligadas glicosidicamente) e 94,49 (C-1 do terminal redutor) indicou um g.p. de ~20. Sinais em δ 65,98; 68,13; 70,01; 81,03; 176,33 também foram assinalados conforme Tabela XXIII e Figura 24.

Os sinais no espectro de r.m.n.-¹³C do bloco M foram diferentes daqueles assinalados no espectro do bloco G puro. Por exemplo, os sinais de C-1 do bloco M foram assinalados a δ 101,02 (correspondendo as unidades ligadas glicosidicamente) e 94,81 (unidade redutora) juntamente com outro a 102,03 (8 % do total de C-1), correspondendo a unidades de gulopiranosidurônico numa relação de 20 : 205 : 11. Este bloco também fornece um sinal de

ESQUEMA E

HIDRÓLISE ACIDA PARCIAL^a DO ALGINATO DE L. brasiliensis.

a. Referência N^o 38.

S = Sobrenadante

R = Resíduo

TABELA XIX - HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO ALGINATO DE L. brasiliensis

Carboidrato	Rendimento ^a (g)	%
Alginato	1.96	100
Fração Hidrolisável, (FH)	0.84	43
Fração Resistente	0.79	40
Fração Solúvel, S-2	0.15	8 (10) ^c
Fração Solúvel, (FS, bloco M)	0.12	6 (6) ^c
Fração Insolúvel, R-2	0.45	23 (15) ^c
Fração Insolúvel, (FI, bloco G)	0.34	17 (13) ^c

a. peso seco à 100°, até peso constante.

b. ácido algínico purificado por base quaternária, pH=7 (cetavlon)

c. Percentagem obtida em outra preparação.

TABELA XX - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PESO MOLECULAR MÉDIO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL^a, CARBOXI-REDUZIDOS DO ALGINATO DE L. brasiliensis

FRAÇÃO ^b	Carboidrato total ^c	Ácido Urônico ^d	PM ^e	Nº Unidades
FI	65	46	2827	16
FS	57	58	4640	26
FI-CMC	60	10	---	--
FS-CMC	72	15	---	--

a. Obtidos por tratamento do ácido algínico com ácido oxálico, (1M por 20 h, 2X, à 100o.), de acordo com o método de HAUG *et al.*³⁸

b. Fração insolúvel (F.I.) e fração solúvel (FS) em pH= 2,85; carboxi reduzidos, segundo processo de TAYLOR & CONRAD¹¹⁹.

c. Determinação realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS).²¹

d. Determinado pelo método de carbazol, segundo BITTER & MUIR.¹²

e. Peso molecular, determinado pelo método de PARK & JOHNSON,⁸⁹ usando a fórmula : $PMm = \frac{\text{Peso da amostra } (\mu\text{g}) \times 173}{\mu\text{g de açúcar redutor}}$

Fator 173= peso molecular de ácido urônico anidro.

TABELA XXI - ROTAÇÃO ÓTICA DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL^a DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L.brasiliensis

FRAÇÃO ^b	$[\alpha]_D^c$	C ^d
F I	-114,4	0,31 d'
F S	- 79,5	0,20 d'
F I - OP	-110	0,53 d''
F S - OP	- 62	0,54 d''

a. Obtidos por tratamento do ácido algínico de L.brasiliensis com ácido oxálico (1M, 2X, 20h à 100o.) segundo HAUG *et al.*³⁸

b. Fração insolúvel (FI) e fração solúvel (FS) em pH 2,85, carboxi-reduzidos (FS-OP e FI-OP) por tratamento com óxido de propileno/ NaBH_4 segundo DEUEL¹⁹ e ASPINALL & CANAS - RODRIGUES⁷.

c. Determinações realizadas à 25°.

d. Concentração dos polissacarídeos expressa em g% em:

d' = água

d'' = solução de NaCl 0,1 M.

TABELA XXII - ROTAÇÃO ÓTICA DO ALGINATO ANTES E APÓS CARBOXI-REDUÇÃO^a COM ÓXIDO DE PROPILENO/NaBH₄

FRAÇÃO ^b	$[\alpha]_D^c$	C ^d
A	-104,2	0,28 d'
A-1-OP	-104,2	0,20 d'
A-2-OP	-114,8	0,22 d"
A-3-OP	-107,3	0,32 d"

a. Esterificação com óxido de propileno, segundo DEVEL¹⁹, seguido de redução do ester com NaBH₄, de acordo com ASPINALL & CANAS-RODRIGUES⁷.

b. Frações de: A= alginato de sódio de L.brasiliensis, e de seus produtos após o primeiro (A-1-OP); segundo (A-2-OP) e terceiro (A-3-OP), tratamento como em "a".

c. Rotação ótica determinada à 25°.

d. Concentração dos polissacarídeos expressa em g% em:

d' = água

d" = solução de NaOH 0,1 M.

TABELA XXIII - SINAIS^a E SUAS ATRIBUIÇÕES OBSERVADAS NOS ESPECTROS DE r.m.n. -¹³C DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis E DE SEUS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL^b, (FS e FI).

Atribuição de sinais	Ácido Algínico	FS ^c	FI ^d
C1	101.02 101.76	101.02	101.76
C2	71.08 66.07	70.92	65.98
C3	72.44 70.22	72.36	70.01
C4	78.92 80.92	78.91	81.03
C5	77.07 68.13	76.85	68.13
C6	175.94	176.16	176.33

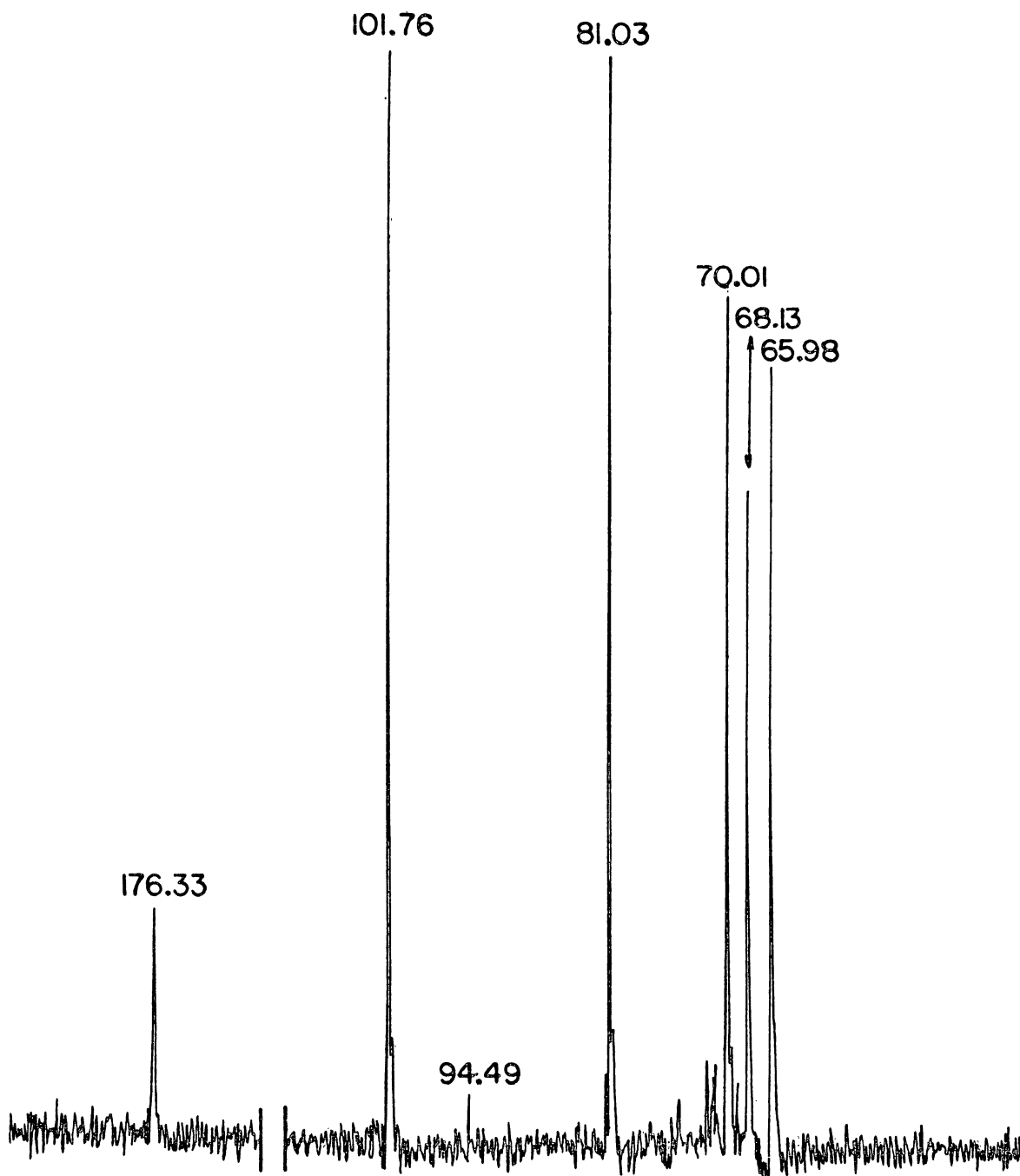
a - Sinais com deslocamentos químicos expressos em (p.p.m.) relativos à ressonância do tetrametilsilano (T.M.S.)

b - Hidrólise ácida parcial segundo HAUG *et al.*³⁸

c - Fração FS= "Blocos" de ácido β -D-manurônico, obtido como em "b".

d - Fração FI= "Blocos" de ácido α -L-gulurônico, obtido como em "b".

FIGURA 24 - ESPECTROS DE r.m.n.-¹³C DOS BLOCOS DE ACIDO α -L-GULURÔNICO DE L. brasiliensis, OBTIDO A 300 MHz EN RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ¹H, NA TEMPERATURA DE 25°, EM D₂O.



δ 81,12 correspondente a substituição em C-4 das unidades de α -L-GulçA.

A comparação das áreas dos sinais das unidades 4-O-substituídas com aquele do terminal redutor, forneceu um g.p. de ~19.

Outros sinais (δ 70,92; 72,36; 76,85; 78,91; 176,16) também foram obtidos conforme dados da Tabela XXIII e Figura 25.

O grau de pureza destes blocos também foi determinado após c.f.g. dos correspondentes blocos M e G após carboxi-redução. O bloco M carboxi-reduzido via C.M.C. (FS-CMC) demonstrou a presença de 95 % de manitol, (2 % de 1,6-anidro guloose e 3 % de glucitol), Figura 26, Tabela XXIV. Pelo mesmo processo anterior de carboxi-redução, o bloco G, (FI-CMC), Figura 27, Tabela XXIV), continha 59 % de glucitol e 36,5 % de 1,6-anidro guloose, (4 % de manitol), o que demonstra um grau de pureza de 96%. Resultados semelhantes foram obtidos por carboxi-redução destes blocos usando óxido de propileno, Tabela XXIV. Estes dados estão em concordância com aqueles obtidos por r.m.n.- ^{13}C .

Na porção da molécula de alginato susceptível a hidrólise parcial, Esquema E, (Fração hidrolisável, FH, 43% de rendimento) apresentou três componentes (solvente "d", visualizador I e II) com RglçA de 1,1; 0,93 e 0,74. Após purificações apropriadas o componente com RglçA de 1,1 foi identificado como uma mistura de ácido manurônico e ácido gulurônico (por análise de r.m.n.- ^{13}C e eletroforese em presença de íons cálcio³²).

FIGURA 25 - ESPECTROS DE r.m.n.- ^{13}C DOS BLOCOS DE ACIDO β -D-MANURÔNICO DE L. brasiliensis, OBTIDO A 300 MHz EN RELAÇO AO NÚCLEO DE ^1H , NA TEMPERATURA DE 25°, EM D_2O .

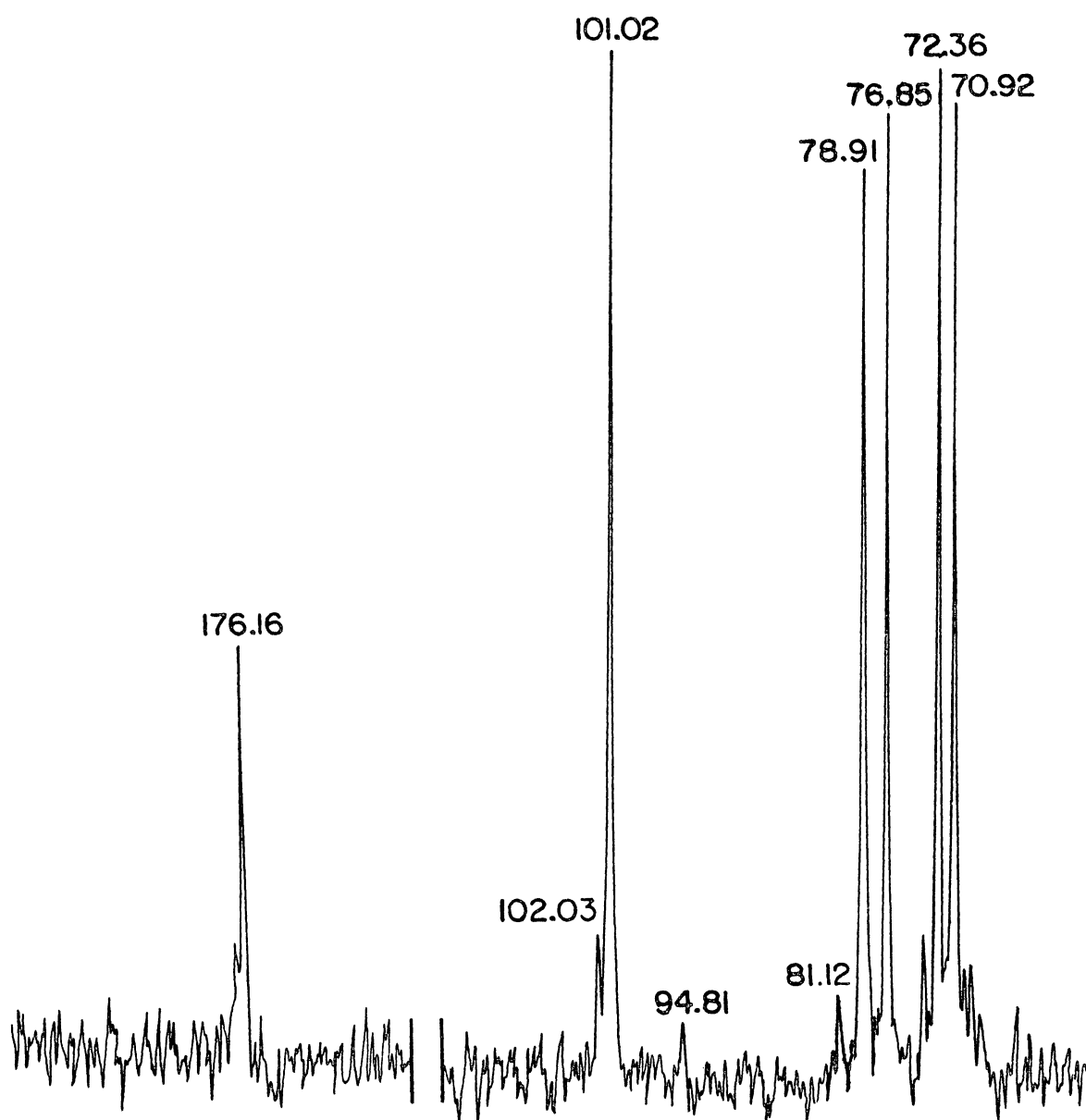


TABELA XXIV-ANÁLISE (c.f.g.)^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ACIDA PARCIAL^b DO ÁCIDO ALGÍNICO DE L. brasiliensis.

Componente	T ^c	FI-OP	FI-OP	FS-CMC	FI-CMC
		%			
1,6 anidro β - α -tri- β -acetil-gulose	0.34	39.4	34.3	traços	traços
manitol hexa- β -acetato	0.77	traços	traços	100.0	100.0
glucitol hexa- β -acetato	1.00	59.6	65.7	traços	traços

a - c.f.g em coluna capilar SP 2340 à 230°.

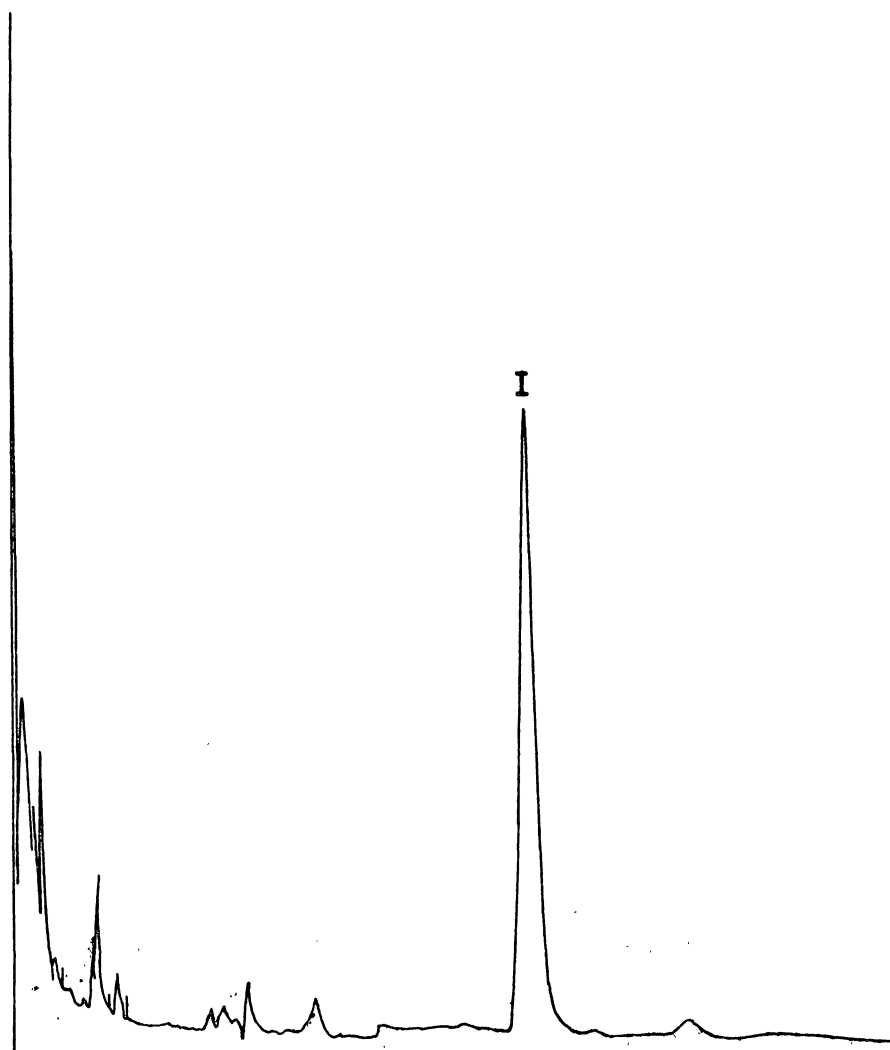
b - Por tratamento do ácido algínico com ácido oxálico 1M (20h por 2X à 100°), de acordo com HAUG *et al.*³⁸

c - Tempo de retenção relativo ao glucitol hexa- β -acetato

d - Fração solúvel, (FS) e fração insolúvel, (FI), obtidas como em "b", carboxi-reduzidas com derivado de carbodiimida (C.M.C.) / NaBH₄, (FS-CMC e FI-CMC)

e - Obtidas como em "b", sendo a carboxi-redução realizada por tratamento com óxido de propileno / NaBH₄ de acordo com DEUEL¹⁹ e ASPINALL & CANAS-RODRIGUES⁷

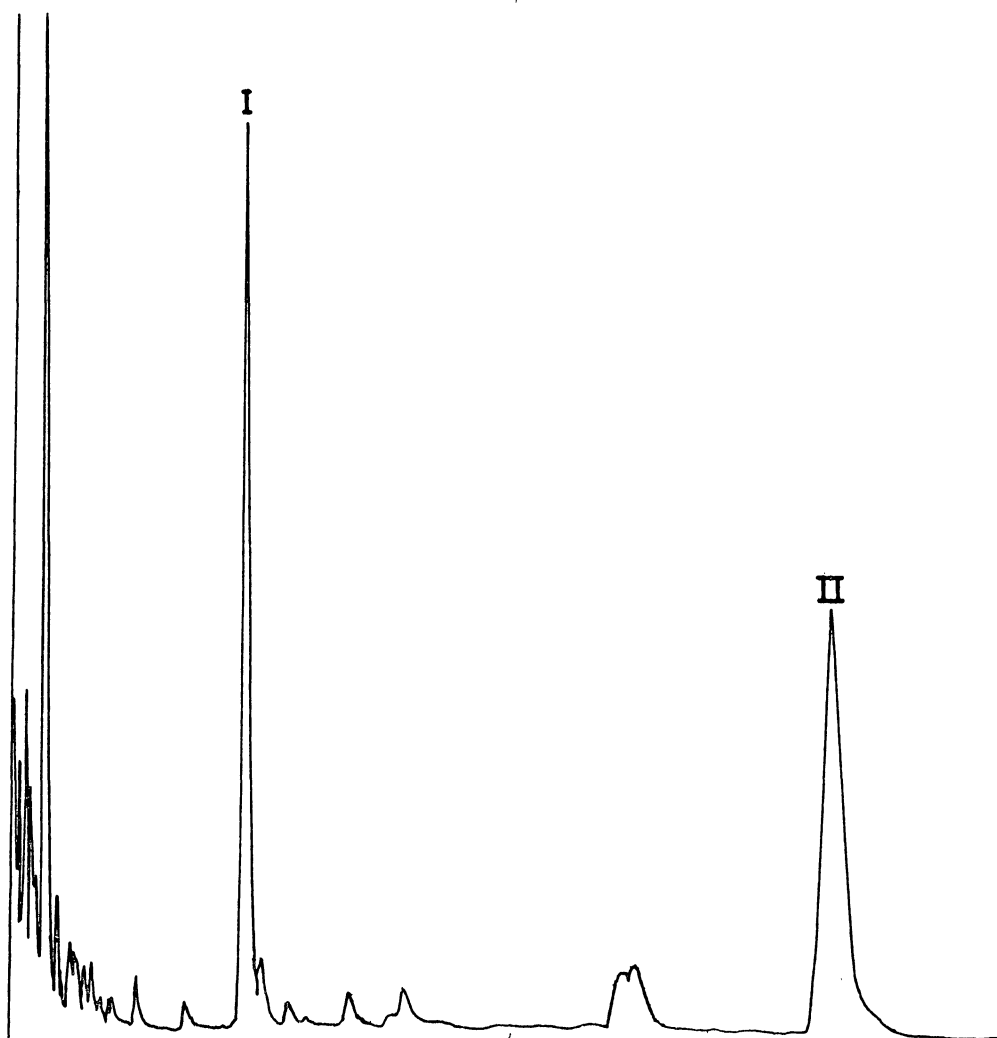
TRAÇOS - correspondem a ~2-5 %

FIGURA 26 - ANÁLISE POR c.f.g.^a DA FRAÇÃO FS-CMC^b.

a - c.f.g. em coluna capilar SP2340 à 230°.

b - Fração solúvel, (blocos de ácido manurônico), obtida por hidrólise ácida parcial do ácido algínico de L. brasiliensis, (HAUG et al.³⁸), carboxi-reduzida com derivado de carbodiimida (C.P.C.) e NaBH₄, segundo TAYLOR & CONRAD¹¹⁹.

I - manitol hexa- β -acetato

FIGURA 27 - ANÁLISE POR c.f.g.^a DA FRAÇÃO FI-CMC^b.

a - c.f.g. em coluna capilar SP 2340 à 230°.

b - Fração insolúvel, (blocos de ácido gulurônico), obtida por hidrólise ácida parcial do ácido algínico de L. brasiliensis, (HAUG *et al.*³⁸), carboxi-reduzida com derivado de carbodiimida (C. .C.) e NaBH₄, segundo TAYLOR & CONRAD⁴¹⁹.

I - 1,6 anidro β -L-tri-O-acetil-gulose

II - glucitol hexa-O-acetato

NISHIDA et al.⁸¹ utilizando uma condição hidrolítica muito menos drástica (HCl 0,3 M por 2h à 100°) isolaram blocos G (37 %) e M (33 %) e uma fração mista MG (30 %) de alginato de L. brasiliensis.

Alginato de L. digitata submetido à hidrólise parcial (ácido oxálico 1M 20 h, 100°) originou uma fração resistente à hidrólise com g.p. 20-30 e tratamento à pH 2,85 conduziu à obtenção de uma fração solúvel com 80-90% de unidades de ácido manurônico e uma insolúvel com 80-90% de unidades de ácido gulurônico³⁸. Uma acurada determinação³⁰ dos componentes de tais blocos baseado no tamanho do respectivo sinal na região de H-1 (r.m.n.-¹H) demonstrou que o bloco M tinha 85% de pureza e o bloco G 90%.

No presente trabalho o isolamento de blocos M e G de alginato de L. brasiliensis com graus de pureza maiores do que os previamente relatados, demonstra que houve preferencial hidrólise na região GM. O modelo estatístico, de PAINTER et al.⁸⁸ propõe que tais blocos poderiam originar-se de hidrólise por acaso (randômica), ao longo da cadeia de ácido algínico. Uma explicação alternativa para a obtenção dos blocos M e G do alginato por processos hidrolíticos, foi fornecida por HAUG et al.³⁸. Estes, sugerem que as frações hidrosolúveis e resistentes do alginato possam ter diferentes graus de cristalinidade. Entretanto MANGRICH et al.⁶⁸ examinando alginato de L. brasiliensis por difração de RX, não observaram evidência de cristalinidade neste polímero. Mas uma tendência de organização "tipo lamelar" (nos blocos M e G) foi observada por difração de RX após complexação destes blocos com íons, (Cu²⁺ ou Vo²⁺). Os derivados com cálcio

não forneceram tal organização.

Portanto, o mecanismo de obtenção dos blocos M e G, por processos hidrolíticos, ainda não está completamente esclarecido.

O alginato de L. brasiliensis é um copolímero binário linear consistindo de unidades de ácido β -D-manurônico e α -L-gulurônico, ambos substituídos em O-4. Uma relação de 1,16:1 foi determinada por r.m.n-¹³C do derivado gulomanana, e confirmada pela análise de c.f.g. dos produtos de hidrólise de tal polímero, (M/G de 1,2:1)

Os dados de metilação do polímero carboxi-reduzido via EDC foram concordantes com os anteriores onde a relação M/G, (2,3,6-tri-D-metil manitol/ 2,3,6,-tri-D-metil glucitol), foi de 1:1.

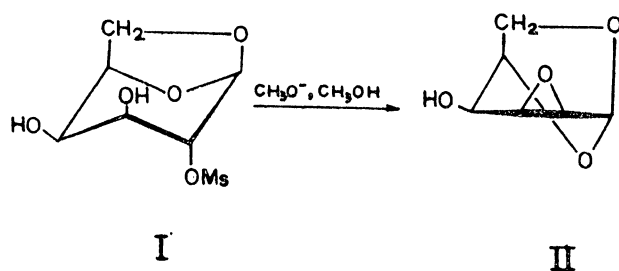
Ao longo da cadeia do alginato de L. brasiliensis estão distribuídos blocos M (9%), G (26%) e regiões híbridas constituídas de unidades M e G (65%).

APÊNDICE I

FORMAÇÃO DO ANEL EPÓXIDO, POR TRATAMENTO ALCALINO, DE
CARBOIDRATO^{22,97}

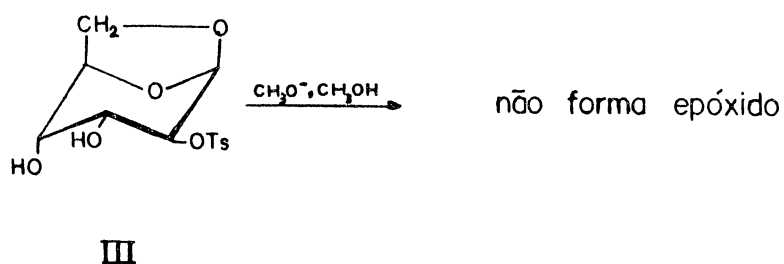
Os epóxido de açúcares são obtidos por reação de deslocamento nucleofílico intramolecular e envolve a participação de grupos hidroxílicos vicinais dos quais, um destes é substituído por um grupo hidroxissulfonato. O anel anidro de três membros é mais facilmente formado quando os átomos dos oxigênios da hidroxila, e aquele do grupo que "sai fácil" ("leaving group"), podem adotar orientações nas quais eles são coplanares e *trans*.

Pela análise conformacional de anéis piranosídicos demonstra-se que tal condição necessita que os grupos vicinais estejam no posicionamento *trans*-diaxial. Usando-se modelos moleculares de derivados hidroxissulfonatos que apresentem hidroxilas livres vicinais é possível construir vários modelos e prever aqueles que formam ou não anel anidro de três membros por tratamento alcalino. Em muitos casos é necessário uma mudança conformacional do anel piranosídico que origina um estado de transição necessário para a formação do anel. O derivado 1,6 anidro-2-O-metanosulfonil β -D-galactopiranosose (I) que possui um arranjo *trans*-diaxial dos grupos em C-2 e C-3, prontamente formará 1,6:2,3-dianidrido- β -D-talopiranosose (II), por tratamento com base.



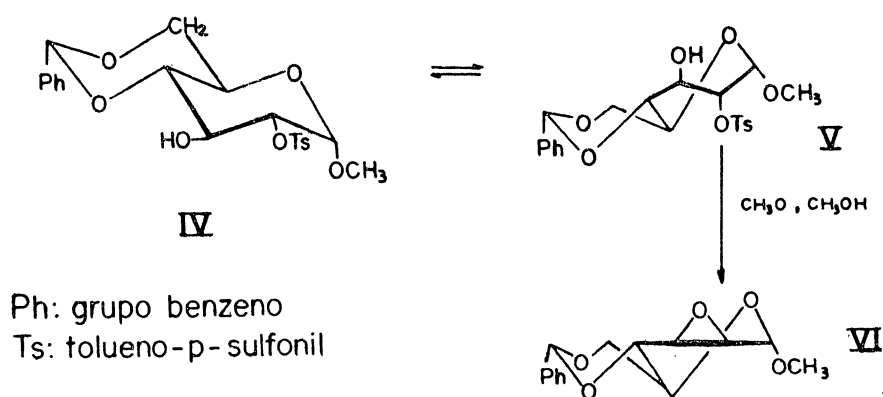
Ms : metanosulfinil

Por outro lado o derivado 1,6 - anidro-2-*D*-tolueno *p*-sulfonil- β -*D*-altropiranosose (III) não forma epóxido, em virtude do posicionamemnto *trans*-diequatorial dos grupos hidroxílicos e ester sulfonatos não permitir, por mudança conformacional a formação de um estado de transição apropriado.



Ts.: tolueno-*p*-sulfonil

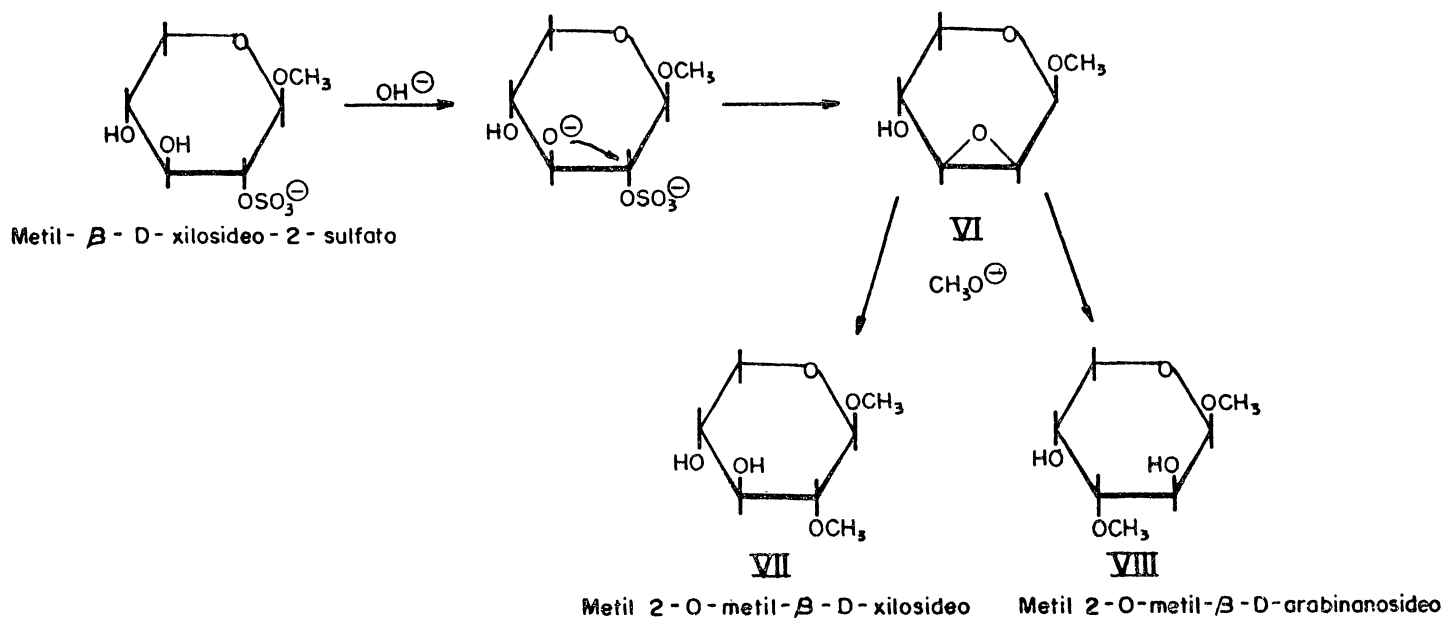
A comprovação que o estado de transição apropriado é decisivo para a formação de epóxido (OH livre e vicinal) é demonstrado com o derivado metil 4,6-*D*-benzilideno-2-*D*-tolueno-*p*-sulfonil- α -*D*-glucucopiranosídeo na conformação 4C_1 (IV).



Embora os grupos hidroxílicos e ésteres sulfonatos estejam em C-2 e C-3 num posicionamento *trans*-diequatorial, tal derivado, (IV), forma por tratamento com alcali, epóxido 2,3-anidro-manosídeo (V). Entre as diversas mudanças conformacionais permitidas, uma coincide com aquela do estado de transição (tipo 3S_5) na qual o substituintes em C-2 e C-3 adotam conformações *trans*-diaxiais favoráveis a formação do anel. Muitos polissacarídeos sulfatados isolados de alga (Phaeophyta ou

Rodophyta) apresentam o grupo ácido (éster) em posição favorável (em carbonos secundários) à formação de epóxido de três membros. Neste caso a abertura do anel, por nucleófilo, dá origem a derivado que permite o estabelecimento da posição do grupo sulfato, como ocorre com o metil xilopiranosídeo 2-sulfato, já descrito anteriormente. (item 4.4.)

A abertura do anel, por nucleófilo ocorre com inversão de Walden, no átomo de carbono que sofre o ataque e dá origem a derivados com configuração trans (S_N2). O ataque do nucleófilo intramolecular é feito em um dos carbonos, mas sempre em oposição ao plano do anel (VI).



Embora o ataque nucleofílico possa ocorrer em qualquer dos carbonos que participam do anel, normalmente ocorre a predominância de um dos derivados de acordo com a estabilidade conformacional do derivado. O derivado VII é formado em mais abundância do que o VIII.

APÊNDICE II

LESSONANAS

Foram observadas variações acentuadas em fucanas isoladas de espécies do mesmo gênero. A fucana de Lessonia flavicans¹²⁴ era constituída somente de L-fucose, [ressonância nuclear magnética de prótons τ 1,20 (CH₃ da fucose); τ 4,97 (hidrogênios do ciclo) e τ 5,43 (hidrogênio anomérico)], e poderia ser classificada como fucana "ideal", segundo KLOAREG et al.⁵². Entretanto a fucana sulfatada de Lessonia nigrescens⁹³ apresentava uma composição química complexa formada de fucose, galactose, manose, xilose numa relação molar de 6:1:2,9:3,5 além de uma alta percentagem de ácido urônico, (26%), sulfato, (9%) e proteína (11,4%). Tal fucana poderia ser classificada como heterofucana contendo ácido urônico na classificação já citada, de KLOAREG.

Por hidrólise ácida parcial a molécula foi fragmentada em oligossacarídeos neutros, constituídos somente de galactose; oligossacarídeos ácidos, e um polímero degradado que continha todos os monossacarídeos do polissacarídeo original. Os oligossacarídeos neutros de galactose, apresentavam substituição em C-2, C-3, C-6 e uma unidade terminal não-redutora. Estes oligossacarídeos por não conterem sulfato diferencia esta fucana daquela denominada Sargassana. Entre os vários oligossacarídeos ácidos obtidos por hidrólise parcial da fucana, dois eram constituídos de ácido glucurônico e fucose. O alto teor de ácido urônico (26,4% em peso ou 43,3% em termos de açúcar total)

diferencia este polímero daqueles classificados como Pelvecianas.

O polissacarídeo degradado, $[\alpha]_D^{20} - 13$, com peso molecular estimado ~ 8.000 era constituído de ácido glucurônico e manose. A carboxi-redução do ácido glucurônico seguido de metilação deu após c.f.g.- e.m., (acetato de alditol), dois componentes (1,4,5-tri- β -acetil-2,3,6-tri- β -metil-glucitol e 1,2,5-tri- β -acetil-2,4,6-tri- β -metil-manitol) indicativos de substituição em C-4 e C-2 das unidades de ácido glucurônico e de manose, respectivamente. A estrutura de uma glucuronomanana com unidades alternativas de dois monossacarídeos é suportada pelos dados de ^1H e r.m.n.- ^{13}C . O espectro de r.m.n.- ^1H apresenta um pico em τ 5,39 (J 5Hz), do H-1 equatorial, da α - β -Manp; b) um duplet em τ 4,47 (J 7,8 Hz) do H1,2 axial do ácido β - β -Glc; c) um pico em τ 4,15 (J \sim 3Hz), correspondendo a H-3 da Manp; d) um quateto em τ 3,39 (J 8 e 9 HZ), indicativos de proton axial acoplado a dois protons axiais vicinais (H-3 do Glc β A ou H-4 da Manp).

Os dados de r.m.n.- ^{13}C do polímero degradado após hidrólise parcial estão reunidos na tabela a seguir:

A presença de uma cadeia principal constituída de ácido β -glucurônico e β -manose, semelhante a descrita pelo autor já fora anteriormente observada em Sargassana por ABDEL-FATTAH^{1,2,3}. A estas cadeias ligam-se cadeias laterais de galactose, (até 7 unidades) e cadeias formadas de ácido glucurônico e fucose. A maioria das unidades de fucose e xilose estão situadas na periferia da molécula.

TABELA XXV - DESVIOS QUÍMICOS DE r.m.n. - ^{13}C DO POLÍMERO DEGRADADO
DE L. nigrescens.

	LITERATURA ^a	DESVIOS OBSERVADOS
C-6 de β -D-Glc _p A	-----	175,4
C-1 de β -D-Glc _p A	104,3	104,4
C-1 de α -D-Man _p	101,9	101,3
C-4 de 4-D- -D-Glc _p A	80,3	80,6
C-2 de 2-D- α -D-Man _p	76,6	75,9
C-3 de β -D-Glc _p A	76,5	75,5
C-5 de β -D-Glc _p A	75,6	-----
C-2 de β -D-Glc _p A	73,8	-----
C-5 de α -D-Man _p	73,7	72,4
C-3 de α -D-Man _p	71,8	-----
C-4 de α -D-Man _p	68,0	69,7
C-6 de α -D-Man _p	62,1	63,4

a - Referências número 8, 10, 26.

B I B L I O G R A F I A

01. ABDEL-FATTAH, A.F.; HUSSEIN, M.; MAGDEL-DIN; SALEM, H.M.
Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from Sargassum linifolium. Carbohydr.Res., 33:9-17, 1974.
02. ABDEL-FATTAH, A.F.; HUSSEIN, M. ; MAGDEL-DIN; SALEM, H.M.
Some structural features of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from Sargassum linifolium. Carbohydr. Res., 33:19-24, 1974.
03. ABDEL-FATTAH, A.F.; HUSSEIN, M.; MAGDEL-DIN; SALEM, H.M.
Constitution of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from Sargassum linifolium. Carbohydr. Res., 33:209-215, 1974.
04. ANNO, K.; SENO, N.; OTA, M. Isolation of L -fucose 4-sulfate from fucoidan Carbohydr. Res., 13:167-169, 1970.
05. ANNO, K.; TERAMATA, H.; HAYASHI, Y.; SENO, N. Isolation and purification of fucoidin from brown seaweed Pelvetia wrightii. Agric. Biol. Chem., 30: 495-499, 1966.
06. APONTE DE OTAOLA, N.E.; DÍAZ-PIFERRER; GRAHAM, H.D. Seasonal variation and anatomical distribution of alginic acid in Sargassum Spp. found along the coasts of Puerto Rico. J. Agric. Univ. P.R., 67: 464-475, 1983.

07. ASPINALL, G.O. & CANAS-RODRIGUEZ, A. Sisal Pectic Acid. J. Chem. Soc., 4020-4027, 1958.
08. BAKER & WALKER, T.E. ¹³C.N.M.R. spectroscopy of isotopically enriched carbohydrates. Methods Carbohydr. Chem. 8:151-171, 1980.
09. BAKER, S.A. & SOMERS, P.J. A spectrophotometric method for the determination of formic acid on the periodate oxidation of carbohydrates. Carbohydr. Res., 3:220-231, 1955.
10. BARRETO - BERGTER, E. & GORIN P.A.J. Determination of galactose - to - galactose and galactose-to-mannose structures in -D-galacto furano- -D-mannopyranans by C-13 NMR spectroscopy. A. C.S.Symposium serv. 150, 149-159, 1981.
11. BERNARDI, G. & SPRINGER, G.F. Properties of highly purified fucan. J. Biol. Chem., 237: 75-80, 1962.
12. BITTER, T. & MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4:330-4, 1962.
13. BOYD, J. & TURVEY, J.R. Identification by ¹³C.n.m.r. spectroscopy of oligosaccharide derived from alginic acid. Carbohydr. Res., 61:223-226, 1978.

14. BRIGGS, J.; FINCH, P.; PERCIVAL, E.; WEIGEL, H. Assignment of the L-configuration to the fucose elaborated by brown seaweeds. Carbohydr. Res., 103:186-189, 1982.
15. BRUNNGRABER, E.G. & BROWN, B.D. Preparation and properties of sialo mucopolysaccharides of obtained from rat brain. Biochem. J., 103:65-72, 1967.
16. CHANDA, S.K.; HIRST, E.L.; PERCIVAL, E.G.V.; ROSS, A.G. The structure of alginic acid. Part II. J. Chem. Soc. , 1833-1837, 1952.
17. CONCHIE, J. & PERCIVAL, E.G.V. Fucoidin. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from Fucus vesiculosus. J. Chem. Soc., 827-832, 1950.
18. COTE, R.H. Dissaccharides from fucoidin. J. Chem. Soc., C:2248-2254, 1959.
19. DEUEL, H. Uber Glykolester der Pektinsaure. Helv. Chim. Acta, 30: 1523-1534, 1947.
20. DOGDSON, K.S. & PRICE, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochem. J., 84 : 106-110, 1962.

21. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-6, 1956.
22. FERRIER, R.J. & COLLINS, P.M. Monosaccharide Chemistry, Penguin, New York, 1972.
23. FISHER, I.S. & PERCIVAL, E. The water-soluble polysaccharides of Cladophora rupestris. J. Chem. Soc., 2666-2675, 1957.
24. GAREGG, P.J. & LINDBERG, B. The constitution of an arboxylan from scots pine (Pinus silvestris) Acta Chem, Scand. 14:871-876, 1960.
25. GARDELL, S. Fractionation on the cellulose columns. Methods Carbohydr. Chem., 5:9-14, 1965.
26. GORIN, P.A.J. & HASKINS, R.H. Futher studies on the rhamnomannans and acidic rhamnomannans of Sporothrix schenckii and Ceratocytis stenoceras. Carbohydr. Res. 55:21-33, 1977.
27. GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Exocellular alginic acid from Azotobacter vinelandii. Can. J. Chem., 44:993-998, 1966.

28. GRASDALEN, H. High-field, ^1H -n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. Carbohydr. Res., 118:255-260, 1983.
29. GRASDALEN, H.; LARSEN, B. and SMIDSRØD, O. ^{13}C -n.m.r. studies of alginate. Carbohydr. Res., 56:C11-C15, 1977.
30. GRASDALEN, H.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. A P.M.R. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. Carbohydr. Res., 68:23-31, 1979.
31. GRASDALEN, H.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. ^{13}C .N.M.R. studies of monomeric composition and sequence in alginate. Carbohydr. Res., 89:179-191, 1981.
32. HAUG, A. & LARSEN, B. Separation of uronic acids by paper electrophoresis. Acta Chem. Scand., 15:1395-1396, 1961.
33. HAUG, A. & LARSEN, B. Quantitative determination of the uronic acid composition in uronates. Acta Chem. Scand., 16: 1908-1918, 1962.
34. HAUG, A. & LARSEN, B. Biosynthesis of alginate. Epimerisation of D-mannuronic to L-guluronic acid residues in the polymer chain. Biochim. Biophys. Acta, 192 : 557-559, 1969.

35. HAUG, A. & LARSEN, B. An extracellular polysaccharide from Beijerinckia indica, containing L-guluronic acid residues. Acta Chem. Scand., 24 : 1855-1856, 1970.
36. HAUG, A. & LARSEN, B. Biosynthesis of alginate. Part I. Composition and structure of alginate produced by Azotobacter vinelandii (Lipman) Carbohydr. Res., 17 287-296, 1971.
37. HAUG, A. & LARSEN, B. Biosynthesis of alginate. Part II. Polymannuronic acid C-5-epimerase from Azotobacter vinelandii (Lipman). Carbohydr. Res., 17:297-308, 1971.
38. HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. Acta Chem. Scand., 20 : 183-190, 1966.
39. HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. Acta Chem. Scand., 21:691-704, 1967.
40. HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. Uronic acid sequence in alginate from different sources. Carbohydr. Res., 32:217-225, 1974.
41. HAUGEN, F.; KORTNER, F.; LARSEN, B. Kinetics and specificity of alginate lyases: Part I, A case study. Carbohydr. Res., 198:101-109, 1990.

42. HEYNS, K. & SCHARMANN, H. Substituenteneinfluss auf das Fragmentierungsverhalten von 1,6-anhydro-hexopyranosen; Zerfallsmechanismen von peracetylierten 1.6 - Anhydrohexosen mit stickstoffhaltigen Ringen. Massenspektrometrische Untersuchungen, 23:3461-3476, 1966.
43. HIRST, E.L.; JONES, J.K.N.; JONES, W.O. The structure of alginic acid. Part I. J. Chem. Soc., 1880-1885, 1939.
44. HIRST, E.L.; PERCIVAL, E.; WOLD, J.K. The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. J. Chem. Soc., 1493-1499, 1964.
45. HIRST, E. & REES, D.A. The structure of alginic acid. Part V. Isolation and unambiguous characterization of some hydrolysis products of the methylated polysaccharide. J. Chem. Soc., 1182-1187, 1964.
46. HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved method for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on paper chromatogram. J. Chem. Soc., 1702-1706, 1950.
47. HOKOMORI, S. A rapid permethylation of glucolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfonium carbanion in dimethyl sulfoxide. J. Biochem., 55:505-508, 1964.

48. HOWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107: 8-16, 1915.
49. HUSSEIN, N. MAGDEL-DIN; ABDEL - AZIZ, A.; SALEN, H.M. Some structural features of a new sulphated heteropolisaccharide from Padina pavonia. Phytochem., 19:2133-2135, 1980.
50. INOUE, Y. & NAGASAWA, K. Selective N-desulfation of heparin with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. Carbohydr. Res. 46: 87-95, 1976.
51. JOLY, A.B. & OLIVEIRA FILHO, E.C. Two Brazilian Laminarias. Inst. Pesq. Marinha, Rio de Janeiro 4: 1-13, 1967.
52. KLOAREG, B.; DEMARTY, M.; QUILLET, M. Extraction et purification du fucoidane de Pelvetia canaliculata (Dcne et Thur). Physiol. Veg., 17:731-747, 1979.
53. KYLIN, H. Hoppe-Seyler s Z. physiol. Chem., 83 : 171. In PERCIVAL, E. & MCDOWELL, R.H. Chemistry and Enzymology of marine algae Polysaccharides. London, Acad. Press., 1967. p. 157.
54. LARSEN, B. & HAUG, A. Biosynthesis of alginate. Part III. Tritium incorporation with polymannuronic acid 5-epimerase from Azotobacter vinelandii. Carbohydr. Res., 20 : 225-232, 1971.

55. LARSEN, B. Sulphated polysaccharide in brown algae. II Isolation of 3-O- β -D-xylopiranosyl-L-fucose from Ascophyllum. Acta Chem. Scand. 21:1395-1396, 1967.
56. LARSEN, B. & HAUG, A. Separation of uronic acids in anion exchange columns. Acta Chem. Scand. 15:1397-1398, 1961.
57. LARSEN, B.; HAUG, A.; PAINTER, T.J. Sulphated polysaccharides in brown algae. I Isolation and preliminary characterisation of three sulphated polysaccharides from Ascophyllum nodosum Acta Chem. Scand. 20:219-230, 1966.
58. LARSEN, B.; HAUG, A.; PAINTER, T. Sulphated polysaccharide in brown algae. III The native state of fucoidan in Ascophyllum nodosum and Fucus vesiculosus. Acta Chem. Scand. 24:3339-3352, 1970.
59. LEONTEIN, K.; LINDBERG, B. and LONNGREN, J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. Carbohydr. Res., 62:359-362, 1978.
60. LESTANG, G. De & QUILLET, m. Renouvellement rapid des esters sulfuriques de la fucoidine des fronds intactes de Pelvetia caliculata. (Dcne et thur) pendent leur immersion em mer. C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D, 277: 2005-2008, 1973.

61. LINKER, A. & JONES, R.S. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas* J. Biol. Chem., 241 : 3845-3851.
62. LLOYD, A.G. & DODGSON, K.S. Infrared studies on sulphate esters II. Monosaccharides sulphates. Biochem. Biophys. Acta 46: 116-120, 1961.
63. LLOYD, P.F. & LLOYD, K.O. The sulphatases of *Patella vulgata*. Biochem. J. 80: 5p, 1961.
64. LLOYD, A.G.; TUDBALL, N.; DODGSON, K.S. Infrared studies on sulphate esters III. Q-sulphate esters of alcohols, amino alcohols and hydroxylated amino acids. Biochem. Biophys. Acta 52: 413-419, 1961.
65. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265, 1951.
66. MACKIE, W.; NOY, R.; SELLEN, D.B. Solution properties of sodium alginate. Biopolymers, 19 : 1839-1860, 1980.
67. MADGWICK, J.; HAUG, A.; LARSEN, B. Polymannuronic acid 5-epimerase from the marine alga *Pelvetia canaliculata* (L.) Dcne. et thur. Acta Chem. Scand., 27 : 3592-3594, 1973.

68. MANGRICH, A.S.; ROMANOWSKI, S.M.M.; DUARTE, J.H.; DUARTE, M.E.R.; CUSATIS, C.; VUGMAN, N.V. Coordenação de íons Vo^{2+} e Cu^{2+} com ácido alginico isolado da alga parda L. brasiliensis. 13^o Reunião Anual da SBQ. Caxambú - MG. Maio, p , 1990.
69. MATULEWICZ, M.C.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S. Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of Gigartina skottsbergii. Phytochemistry, 28: 2937-2941, 1989.
70. McNEELY, W.H. & PETTIT, D. Algin. in WHISTLER, R.J. Industrial Gums. 2 ed. New York, Acad. New York, 1973. p.49-81.
71. MEDCALF, D.G. & LARSEN, B. Fucose-containing polysaccharides in the brown algae Ascophyllum nodosum and Fucus vesiculosus. Carbohydr. Res., 59, : 531-537, 1977.
72. MEDCALF, D.G. & LARSEN, B. Structural studies on ascophyllan and the fucose-containing complexes from the brown alga Ascophyllum nodosum. Carbohydr. Res., 59 : 539-546, 1977.
73. MOAHMED, M. El-SAYED. The polysaccharides of the brown Seaweed Turbinaria murrayana. Carbohydr. Res. 110:277-282, 1982.

74. MIAN, A.J. & PERCIVAL, E. Carbohydrates of the brown seaweeds Himanthalia lorea, Bifurcaria bifurcata, and Padina pavonia. Part II. Structural studies of the "fucans". Carbohydr. Res., 26: 147-161, 1973.
75. MIAN, A.J. & PERCIVAL, E. Carbohydrates of the brown seaweeds Himanthalia lorea, Bifurcaria bifurcata, and Padina pavonia. Part I. Extraction and fractionation. Carbohydr. Res., 26: 133-146, 1973.
76. MINGHOU J. M. H. C.; YUJUN, W.; ZUHONG X.; YUCAI, G. Studies on M:G ratios in alginate. Hidrobiologia, 116/117: 554-556, 1984.
77. MORRIS, E.R.; REES, D.A.; THOM, D. Characterisation of polysaccharide structure and interactions by circular dichroism order-disorder transition in the calcium alginate. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 245-246, 1973.
78. MORRIS, E.R.; REES, D.A.; THOM, D.; BOYD, J. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific primary dimerisation process in alginate gelation. Carbohydr. Res., 66: 145-154, 1978.
79. NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; KAMAIA, T. Solvolytic dessulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. Carbohydr. Res. 58: 47-55, 1977.

80. NEUMULLER, G. & VASSEUR, E. The influence on the periodate oxidation of carbohydrates. Ark. Kemi., 5(21):235-245, 1953.
81. NISHIDE, E.; ANZAI, H. and UCHIDA, N. Extraction of alginic acid from a Brazillian brown alga, Laminaria brasiliensis. Hydrobiologia 151/152:551-555, 1987.
82. OLIVEIRA FILHO, E.C. Deep water marine algae from Espirito Santo State (Brazil). Bol. Botânica Univ. S. Paulo, 4:73-80, 1976.
83. OLIVEIRA FILHO, E.C. & QUEGE, N. Distribuição de espécies de Laminaria (Phaeophyta) no Brasil. Ciênc. Cult. (Supl.), 29: 537, 1977.
84. OLIVEIRA FILHO, E.C. & QUEGE, N. O gênero Laminaria (Phaeophyta) no Brasil. Inst. Pesq. Tecnológicas, São Paulo, 1107, 18p. 1978.
85. O'NEILL, A.L. Degradative studies on fucoidin. J. Am. Chem. Soc., 76: 5074-5076, 1954.
86. ORR, S.F.D. Infra-red spectroscopic studies of some polysaccharides. Biochem. Biophys. Acta 14: 173-181, 1954.

87. OTAOLA, N.E.A.; DIAZ-PIFERRER, M.; GRAHAM, D.H. Seasonal variations and anatomical distribution of alginic acid in *Sargassum* Spp. Found along the coasts of Puerto Rico. J. Agric. Univ. PR. 67:464-475, 1983.
88. PAINTER, T.; SMIDSRØD, O.; LARSEN, B.; HAUG, A. A computer study on the changes in composition and distribution occurring during random depolymerization of a binary linear polysaccharide. Acta Chem. Scand., 22 : 1637-1648, 1968.
89. PARK, J.T. & JOHNSON, M.J. A submicro determination of glucose. J. Biol. Chem., 181:149-151, 1949.
90. PENMAN, A. & SANDERSON, G.R. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. Carbohydr. Res., 25:273-282, 1972.
91. PERCIVAL, E. Glucuronoxylfucan, a cell-wall component of Ascophyllum nodosum. Part I. Carbohydr. Res. 7: 272-283, 1968.
92. PERCIVAL, E. Glucuronoxylfucan, a cell-wall component of Ascophyllum nodosum: Part II. Methylation. Carbohydr. Res. 17: 121-126, 1971.
94. PERCIVAL, E.; RAHMAN, A.; WEIGEL, H. Chemistry of the polysaccharides of the brown seaweed Dictyopteris plagiogramma. Phytochemistry, 20: 1579-1582, 1981.

93. PERCIVAL, E.; JARA, M.F.V.; WEIGEL, H. Structural studies of the water-soluble fucan from Lessonia nigrescens. Carbohydr.Res., 125:283-290, 1984.
95. PERCIVAL E.G.V. & ROSS A.G. Fucoidin-Part I. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. J. Chem. Soc., 717-720, 1950.
96. PERCIVAL, E. & MCDOWELL, R.H. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. Academic Press, New York, p 1-219, 1967.
97. PERCIVAL, E. & WOLD J.K. The acid polysaccharide from the green seaweed Ulva lactuca. Part II. The site of the ester sulphate. J. Chem Soc. 5449-5468, 1963.
98. PERCIVAL, E. & YOUNG, M. Carbohydrates of the brown seaweeds Part III. Desmarestia aculeata. Carbohydr. Res., 32 : 195-201, 1974.
99. PERLIN, A.S. & CASÚ, B., Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C. Tetrahedron Lett., 2921-2924, 1969.
100. QUÉGE, M. & HWA, C.M.F. Problemas metodológicos na estimativa de biomassa de macrófitas bentônicas de profundidade. Ciênc. Cult., 36: 1188-1193, 1984.

101. QUILLET, M. & LESTANG-BREMOND, G. Sorbitol, a precursor of L-guluronic acid in alginic acid biosynthesis. Phytochemistry 24:43-45, 1985.
102. RAO, PRASADA N.V.S.A.; SASTRY, K.V.; VENKATA RAO, E. Carbohydrates of Padina tetrastratica. Phytochem. 23:2531-2533, 1984.
103. REES, D.A. A note on the characterization of carbohydrate sulphate by acid hydrolysis. Biochem. J. 88: 343-345, 1963.
104. REVIERS, B.; MARBEAUS, S.; KLOAREG, B. Essai d'interprétation de la structure des fucoidanes en liaison avec leur localisation dans la paroi des péophycées. Crypt. Algol. 4: 55-62, 1983.
105. SCHWEIGER, R.G. Acetylation of alginic acid. I. Preparation and viscosities of algin acetates. J. Org. Chem. 27:1786-1789, 1962.
106. SCHWEIGER, R.G. Acetylation of alginic acid. II. Reaction of algin acetates with calcium and other divalent ions. J. Org. Chem. 27:1789-1791, 1962.
107. SCHWEIGER, R.G. Methanolysis of fucoidan. I. Preparation of methyl α -L-fucoside and L-fucose. J. Org. Chem. 27:4267-4269, 1962.

108. SCHWEIGER, R.G. Methanolysis of fucoidan. II. The presence of sugars other than L-fucose. J. Org. Chem. 27:4270-4272, 1962.
109. SIDDIQUI, I.R. A convenient procedure for producing gram-quantities of brucine L-guluronate and brucine D-mannuronate. Carbohydr. Res., 80:343-345, 1980.
110. SKJAK-BRAEK, G. Effect on acetylation on some solution and gelling properties of alginates. Carbohydr. Res., 185:131-138, 1989.
111. SMIDSRØD, O. & HAUG, A. Dependence upon uronic acid composition of some ion-exchange properties of alginates. Acta Chem. Scand., 22 : 1989-1997, 1968.
112. SOMOGYI, N. Notes on sugar determination J. Biol. Chem. 195 19-23, 1952.
113. STANFORD, E.C.C. Chem. News. Lon. 96 : 254, 1883. In PERCIVAL, E. & MCDOWELL, R.H. Chemistry and enzymology of marine algae polysaccharides. London, Acad. Press., 1967. p.99.
114. STAUB, A.M. Removal of proteins. Methods Carbohydr. Chem., 5:5-6, 1965.

115. STEWART, L.C. & RICHTMYER, N.K. Transformation of D-gulose to 1,6-anhydro- β -D-gulopyranose in acid solution. J. Am. Chem. Soc., 77 : 1021-1024, 1955.
116. STONE, B.A. & ANDERSON M.A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid group in polysaccharides. Carbohydr.Polym, 5 115-120, 1985.
117. STORTZ, C.A. & CEREZO, A.S. Dessulfation of the "soluble" carrageenans of Iridaea undulosa and methylation analysis of its partially desulfated component An. Assoc. Quim. Argent. 74 (4): 353-360, 1986.
118. STOCKTON, B.; EVANS, L.V.; MORRIS, E.R.; POWELL, D.A.; REES, D.A. Alginate block structure in Laminaria digitata: Implications for holdfast attachment. Bot. Marina, 23: 563-567, 1980.
119. TAYLOR, R.L. & CONRAD, H.E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. Biochemistry, 11 (8):1383-1388, 1972.
120. TIMELL, T.E.; ENTERMAN, W.; SPENCER, F.; SOLTES, E.J. The acid hydrolysis of glycosides. II. Effect of substituents at C-5. Can. J. Chem., 43:2296-2304, 1965.

121. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166:444-445, 1950.
122. TURVEY, J.R. Sulfates of simple sugars. Adv. Carbohydr. Chem., 20: 183-218, 1965.
123. USOV, A.I.; ADAMYANTS, K.S.; MIROSHNIKOVA, L.I.; SHAPOSHNIKOVA, A.A.; KOCHETKOV, N.K. Solvolytic desulphation of sulphated carbohydrates. Carbohydr. Res. 18: 336-338, 1971.
124. VILLARDEL, L.H. & ZANLUGO, A.B. Polisacaridos solubles de algas chilenas. I - El fucoidano de la Lessonia flavicans. Rev. Latinoamer. Quim., 6: 127-130, 1975.
125. WHISTLER, R.L. & BEMILLER, J.N. Cellulose column chromatography Methods Carbohydr. Chem., 1:47-50, 1962.
126. YAPHE, W. Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides. Anal.Chem. 32:10-13, 1960.

SUMMARY

On extraction, the brown seaweed Laminaria brasiliensis furnished two types of acidic polysaccharides, namely sulfated heterofucans and alginic acid. Its only carbohydrate of low molecular weight was mannitol.

The alginate (22.4 % yield) is a linear binary copolymer consisting of units of β -D-mannopyranose (uronic acid) (M) and α -L-gulopyranose (uronic acid) (G), both substituted at O-4. An M/G ratio of 1.16 was determined by ^{13}C -n.m.r. spectroscopy of a derived gulomannan and was confirmed by g.l.c.-m.s. of derived monosaccharide fragments and by methylation analysis incorporating g.l.c.

The isolation of virtually homogeneous oligosaccharides containing mannuronic and guluronic acid respectively, following partial hydrolysis of alginate, shows that it contains block-like structures. Blocks M and G have d.p.'s of 19-26 and 16-20 respectively and are interspersed with hybrid regions containing both M and G units. Block M contains 8% of G and block G less than 2% of M, their homogeneity being greater than blocks isolated in studies on alginates of other species. L. brasiliensis also synthesises various sulfated polysaccharides containing principally fucose, along with mannose, galactose, glucose, xylose, and uronic acid. Polysaccharides isolated via DEAE-cellulose column chromatography contained the same monosaccharides, albeit in variable proportions, showed that the

original polysaccharide consists of a family of related sulfated components, named heterofucans.

The units of α -L-fucopyranose (63%) in one of isolated fractions are glycosylated at O-2 and contain sulfate esters at C-4. The location of the sulfate groups was confirmed by isolation of fucose 4-sulfate on partial hydrolysis and by I.R. spectroscopy (absorption at 845 cm^{-1}). The stability of the sulfate group to the action of alkali is typical of a *cis*-vicinal arrangement. Only a *trans* arrangement would be readily eliminated.

A mannose, (73,5 %) and uronic acid containing fraction was obtained on removal of fucose with acid from one of the fractions of the heterofucans. Hydrolysis of the carboxy-reduced fraction gave mannose, (78 %) and glucose, (8 %) indicating that the acidic component is glucuronic acid. This fraction was subjected to Smith degradation and the formation of erythritol (23,5 %) and glycerol, (26,3 %) is consistent with (1 \rightarrow 4) and (1 \rightarrow 6) linkages.

Another fraction rich in galactose (partial hydrolysis) was examined using the chiral reagent (-)-2-octanol and g.l.c. of the derived acetate of the octyl glycoside showed that galactose has the L-form. This isomer has not been previously observed in heterofucans of brown seaweeds. In common with fucans previously investigated, the sequence of the above components was not completely elucidated.

PUBLICAÇÕES

1. DUARTE, M.E.R.; GORIN, P.A.J.; DUARTE, J.N. Homogeneous guluronic and mannuronic acid blocks in the alginate of brown seaweed Laminaria brasiliensis. "in press".
2. DUARTE, J.H.; DUARTE, G.R.; FONTANA, J.D.; IACOMINI, M.; LOPES, L.C.V.; FEIJÓ, M.A.L.; GORIN, P.A.J.; DUARTE, M.E.R. The polysaccharide from brown seaweed Laminaria brasiliensis. Arq. Biol. Tecnol. 27 (2):151, 1984.
3. DUARTE, M.E.R.; DUARTE, J.H.; GORIN, P.A.J. Carbon-13 n.m.r.-method for determination of the mannuronic/guluronic acid ratio in alginic acids. Arq. Biol. Tecnol., 28 (1): 84, 1985.
4. DUARTE, M.E.R.; DUARTE, G.R.; RAMOS, L.P.; DUARTE, J.H.; GORIN, P.A.J. Evidence for the presence of "BLOCK-TYPE" structures in the alginic acid of Laminaria brasiliensis: Isolation of (1 → 4)-linked gulopyranan following partial hydrolysis and reduction. Arq. Biol. Tecnol., 29 (1): 84, 1986
5. DUARTE, M.E.R.; GORIN, P.A.J.; DUARTE, G.R.; DUARTE, J.H. O-Sulfated polysaccharides isolated from the brown alga Laminaria brasiliensis. Arq. Biol. Tecnol., 30(1): 108, 1987.

6. DUARTE, M.E.R.; GORIN, P.A.J.; DUARTE, G.R.; FONTANA, J.D.; DUARTE, J.H. Sulphated fucan isolated from brown seaweed, Laminaria brasiliensis. Arq. Biol. Tecnol., 31 (1):95, 1988.

7. DUARTE, M.E.R.; GORIN, P.A.J.; DUARTE, J.H. An Acidic heteropolysaccharide isolated from the brown seaweed Laminaria brasiliensis. PAABS VI Congress, São Paulo, L-16, 1990.