

**ESTUDO DE UMA PORFIRANA COM ESTRUTURA
NÃO USUAL OBTIDA DA ALGA VERMELHA**
Porphyra columbina Montagne
(BANGIALES, RHODOPHYTA).

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2001

Adriano Gonçalves Viana

**ESTUDO DE UMA PORFIRANA COM ESTRUTURA NÃO USUAL
OBTIDA DA ALGA VERMELHA *Porphyra columbina* MONTAGNE
(BANGIALES, RHODOPHYTA).**

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


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

Prof^a. Dr^a. Eliana Beleski Borba Carneiro
Departamento de Bioquímica, UFG

Prof^a. Dr^a. Juliana Maurer Menestrina
Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof^a. Dr^a. Selma Faria Zawadzki Baggio
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba
2000

Orientador:
Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-Orientador:
Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Rabello Duarte

Dedico esta tese a minha mãe e aos
meus irmãos Cristina e Luís.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me conceder inteligência, bom humor, tranquilidade, paciência e endorfinas sem os quais não teria conseguido concluir a redação desta tese em tempo hábil!!!!!!

Ao Miguel, por tudo que me ensinou e pela paciência para comigo durante estes 5 anos de orientação (estágio, monitoria, iniciação científica, monografia e mestrado), desde já agradecendo pelos próximos 4 anos (doutorado!!!!!!!!!!).

A Professora Maria Eugênia pela co-orientação e amizade.

As professoras Selma, Juliana e Eliana, por terem aceito prontamente o convite de integrarem esta banca, muito obrigado.

Aos amigos do laboratório de Química de Carboidratos de Algas Marinhas: Rosiane, Paula, Alan, Sérgio, Danielle (Dani, para não ficar brava!!!), Flávia, Diogo, Alexandre, Fabíola e Marco, pelas brincadeiras, companheirismo e agradável convivência, com a certeza de que nossa caminhada juntos esta apenas começando!!!!

Aos grandes amigos Carol, Lilian e Luciano, vocês me perseguem heim, na graduação, no mestrado, agora só falta no doutorado!!!

As queridas amigas Andréa e Angela, pelos momentos de alegria e sofrimento que compartilhamos durante este primeiro ano de mestrado e pelos muitos mais que ainda estão por vir durante nossa permanência neste departamento!!!!

Ao amigo Jean, pelos ensinamentos de química orgânica (muito valiosos), mas principalmente pela nossa amizade, saudades dos velhos tempos de convivência diária, valeu irmão!!!!

Aos amigos da turma de mestrado 2000: Rodrigo Reis, Carol M., Ana Paula, Stefan e Angelita; aos amigos do departamento: Gisele, Ana Paula, Luciane, Sílvia, Heloísa, Juan (agradecimento especial pelas análises de GPC), Andreia (agradecimento especial pelas análises de CLG), Ju e Humberto, Guilherme, Renato, Rose Adele e César (pelas análises de CLG-EM e RMN) e a todos os demais colegas do departamento pelos momentos de descontração extra-universidade e papos de corredor, pois não podemos viver só de ensino, pesquisa e extensão!!!!!!

Aos professores do Departamento de Bioquímica que contribuíram para a minha formação no que diz respeito à Pós-Graduação.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, à Dona Marilza e as bibliotecárias, pela colaboração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ALGAS: ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS.....	3
1.2.1. A DIVISÃO RHODOPHYTA.....	3
1.3. CARBOIDRATOS DE ALGAS MARINHAS.....	8
1.3.1. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA.....	8
1.3.2. CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR.....	8

1.3.3. POLISSACARÍDEOS ESTRUTURAIS DA PAREDE CELULAR.....	12
1.3.3.1. AS GALACTANAS SULFATADAS.....	13
1.3.3.1.1. As carragenanas.....	14
1.3.3.1.2. As agaranas.....	18
1.3.3.1.3. As porfiranas.....	20
1.4. HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL.....	22
1.5. OLIGOSSACARÍDEOS E HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL.....	23
1.6. TRATAMENTO ALCALINO.....	27
1.7. METILAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	28
1.8. MECANISMO DE FORMAÇÃO DE GÉIS.....	30
1.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
2. OBJETIVOS.....	33

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. MATERIAL.....	34
3.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	34
3.3. ESTUDO DAS PORFIRANAS SULFATADAS.....	35
3.3.1. TRATAMENTO ALCALINO.....	35
3.3.2. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA.....	35
3.3.3. HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL.....	36
3.3.4. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL.....	36
3.3.5. METILAÇÃO.....	36
3.3.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GRUPOS SULFATO.....	37
3.3.7. POLARIMETRIA.....	37
3.3.8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	37

3.3.8.1. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO EM SEPHAROSE	
2-B.....	37
3.3.8.2. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO EM BIOGel	
P-2.....	37
3.3.8.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (CLG).....	38
3.3.8.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA	
A ESPECTROSCOPIA DE MASSA (CLG-EM).....	38
3.3.8.5. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA	
PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE	
REFRAÇÃO DIFERENCIAL E ESPALHAMENTO DE LUZ EM	
MULTIÂNGULOS (MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA	
MOLECULAR.....	39
3.3.8.5.1. Determinação da variação do índice de refração com	
relação à concentração (dn/dc).....	39
3.3.8.5.2. Análise de homogeneidade e de determinação da massa	
molecular ponderal média (M_w).....	39

3.3.9. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	40
3.3.9.1. TÉCNICAS DE RMN MONODIMENSIONAIS.....	40
3.3.9.1.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - ^{13}C).....	40
3.3.9.1.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 DEPT (DISTORTIONLESS ENHANCEMENT BY POLARIZATION).....	40
3.3.9.1.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN – ^1H).....	41
3.3.9.2. TÉCNICAS DE RMN BIDIMENSIONAIS.....	41
3.3.9.2.1. COSY (CORRELATION SPECTROSCOPY).....	41
3.3.9.2.2. TOCSY (TOTAL CORRELATION SPECTROSCOPY).....	42
3.3.9.2.3 HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY).....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43

5. CONCLUSÕES.....	89
---------------------------	-----------

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Diagrama do ciclo reprodutivo de <i>Porphyra spp</i> (SOTH e WHITTICK, 1987), mostrando a alternância de gerações entre uma fase gametofítica haplóide (A) e outra conchocelular diplóide (B).....	7
FIGURA 2: Estrutura química dos florideosídeos, Isofloridosídeos (formas D e L) e digeneasídeo, os carboidratos de baixa massa molecular presentes nas algas pertencentes a divisão Rhodophyta.....	10
FIGURA 3: Estrutura apresentada pelos polialcoóis D-manitol, D-sorbitol e dulcitol encontrados em diferentes grupos de algas vermelhas.....	10
FIGURA 4: Estrutura básica repetitiva apresentada pelas carragenanas.....	15
FIGURA 5: Estrutura básica repetitiva apresentada pelas agaranas.....	18
FIGURA 6: Estrutura repetitiva “mascarada” apresentada pelas porfiranas.....	20
FIGURA 7: Produtos de hidrólise reductiva parcial obtidos a partir da agarose e de carragenanas contendo 3,6-anidrogactose (USOV, 1998).....	26

FIGURA 8: Reação de ciclização em galactanas do tipo agarana: transformação das unidades de α-L-galactose 6-sulfato (1C_4) em 3,6-anidro-α-L-galactose (4C_1), em meio alcalino.....	27
FIGURA 9: Alga <i>Porphyra columbina</i> Montagne, fase gametofítica.....	43
FIGURA 10: Fluxograma da extração dos polissacarídeos da alga <i>Porphyra columbina</i> Montagne.....	44
FIGURA 11: Perfil cromatográfico apresentado pela fração PC66 mediante análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS, a qual apresentou moléculas contaminantes com elevada e reduzida massa molecular.....	45
FIGURA 12: Fluxograma da purificação dos polissacarídeos e da fração PC66 de <i>Porphyra columbina</i> Montagne.....	46
FIGURA 13: Perfil cromatográfico apresentado pela fração PC66sol mediante análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS, mostrando apenas baixa contaminação por possíveis agregados moleculares.....	47
FIGURA 14: Perfil de eluição da fração PC66sol em Sepharose 2-B (eluição NaCl 1M) indicando a delimitação das sub-frações purificadas PC66A, PC66B, PC66C e PC66D.....	48

FIGURA 15: Perfil cromatográfico apresentado pela fração PC66B mediante análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS, mostrando baixa contaminação por possíveis agregados moleculares.....48

FIGURA 16: Alteração química e estrutural decorrente do tratamento alcalino: conversão das unidades precursoras de α -L-galactose 6-sulfato (A) para 3,6-anidro- α -L-galactose (B).....52

FIGURA 17: Estrutura apresentada pelo grupo acetal de ácido pirúvico [4,6-O-(1-carboxietilideno)] esterificando uma unidade β -D-galactose, indicando os deslocamentos químicos característicos de seus carbonos metílico (25,0 ppm), carbonílico (175,3 ppm) e acetálico (101,3 ppm) bem como do carbono 6 substituído (64,9 ppm), por RMN de ^{13}C54

FIGURA 18: Espectro de RMN de ^{13}C da fração PC66 (em D_2O a 70°C), indicando o assinalamento correspondente aos carbonos anoméricos de cada unidade constituinte deste polissacarídeo.....55

FIGURA 19: Comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C das frações PC66 e PC66m₃ evidenciando o aumento no teor de 3,6-anidro- α -L-galactose após tratamento alcalino.....58

FIGURA 20: Comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C das frações PC66m₃ e PC75m₃ (NOSEDA *et al.*, 2000 - b), mostrando além de uma alta similaridade um conjunto de sinais exclusivamente encontrados na PC66m₃.....59

FIGURA 21: Espectro de RMN de ^{13}C em DEPT ($\theta_z = 135$) da fração PC66m₃ mostrando a inversão do sinal em 68,8ppm.....60

FIGURA 22: Estrutura parcialmente determinada para as porfiranas constituintes da fração PC66: mostrando a ocorrência de unidades de β -D-galactose substituídas glicosidicamente em C-1 e C-3 e por um grupo R em C-6, um provável ponto de ramificação.....66

FIGURA 23: Perfil de eluição do produto de hidrólise parcial da fração PC66Bm₃ em BIOGel P-2 indicando a delimitação das sub-frações purificadas PC66m₃-1, PC66m₃-2, PC66m₃-3 e PC66m₃-4.....68

FIGURA 24: Espectro de RMN de ^{13}C da fração PC66m₃-3 mostrando uma mistura de dois dissacarídeos devido aos sinais duplos de C-3 (83,44 e 83,55 ppm) e C-4 (85,34 e 85,43 ppm) da 3,6-anidro-L-galactitol.....70

FIGURA 25: Espectro de RMN de ^{13}C em DEPT ($\theta_z = 135$) da fração PC66m₃-3 mostrando a inversão dos carbonos primários das unidades monossacarídicas e da morfolina.....	71
FIGURA 26: Espectro de RMN de correlação HMQC [$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$] da fração PC66m₃-3.....	73
FIGURA 27: Espectro de COSY [$^1\text{H} - ^1\text{H}$] da fração PC66m₃-3 mostrando a correlação entre prótons vicinais dentro de cada unidade monossacarídica.....	74
FIGURA 28: Espectro de TOCSY [$^1\text{H} - ^1\text{H}$] da fração PC66m₃-3, mostrando a correlação entre todos os pr'tons dentro de cada unidade monossacarídica.....	75
FIGURA 29: Estrutura química dos dissacarídeos constituintes da fração PC66m₃-3: agarobiitol (A) e 6-O-metil agarobiitol (B), como determinada através de técnicas de RMN.....	77
FIGURA 30: Espectro de RMN de ^{13}C da fração PC66Bm₃-2, os sinais em 102,68, 82,04, 73,33 e 59,88 ppm foram observados anteriormente na fração PC66m₃ e referem-se a um grupo substituínte de natureza glicosil.....	78

FIGURA 31: Espectro de RMN de ^{13}C em DEPT ($\theta_z = 135$) da fração PC66m₃-2 mostrando a inversão de três sinais.....80

FIGURA 32: Espectro de correlação HMQC [$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$] da fração PC66m₃-2.....82

FIGURA 33: Espectro de COSY [$^1\text{H} - ^1\text{H}$] da fração PC66m₃-2 mostrando a correlação entre prótons vicinais dentro de cada unidade monossacarídica.....83

FIGURA 34: Espectro de TOCSY [$^1\text{H} - ^1\text{H}$] da fração PC66Bm₃-2, mostrando a correlação entre todos os prótons dentro de cada unidade monossacarídica.....84

FIGURA 35: Trissacarídeo constituinte da fração PC66m₃-2, formado por unidades de 6-O-metil- β -D-galactopirranose, β -D-galactopirranose e 3,6-anidro-L-galactitol com a seguinte estrutura: [6-O-me- β -D-Galp-4-sulfato(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6-AnGalOH], estando as unidades de 6-O-metil- β -D-galactopirranose substituídas em C-4.....86

FIGURA 36: Estrutura não usual determinada para as porfiranas constituintes da fração PC66, isoladas da alga vermelha *Porphyra columbina*

Montagne, contendo unidades de β-D-galactose como ponto de ramificação para unidades de 6-O-metil β-D-galactose 4-sulfato.....	88
---	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação das carragenanas de acordo com a distribuição dos grupos sulfato nas unidades a e B (GREER & YAPHE, 1984).....	17
TABELA 2: Composição monossacarídica das frações nativa (PC66) e modificadas por tratamento alcalino^a (NaOH 1M, 80°C) durante 1 (PC66m₁) e 3 horas (PC66m₃), determinada por CLG, após hidrólise redutiva^b, na forma de alditois acetatos, em mol%.....	49
TABELA 3: Deslocamentos químicos dos carbonos da fração pc66m₃, observados nos espectro de RMN de ¹³C comparados aos da fração PC75m₃ (NOSEDA <i>et al.</i>, 2000 - b).....	61
TABELA 4: Composição monossacarídica apresentada pelas frações nativa (PC66) e quimicamente modificada por tratamento alcalino (PC66m₃) antes e após 6 séries de metilação^a, na forma de alditois acetilados, em mol%.....	65
TABELA 5: Deslocamentos químicos dos carbonos e prótons dos dissacarídeos constituintes da fração PC66m₃-3, identificados a partir de suas correlações observadas nos espectros de HMQC, COSY e TOCSY.....	76

TABELA 6: Deslocamentos químicos dos carbonos e prótons do trissacarídeo constituinte da fração pc66m₃-2, identificados a partir dos espectros de HMQC, COSY e TOCSY.....	85
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PC66 - fração obtida por extração aquosa a temperatura ambiente e precipitada com 2 volumes de etanol;

PC75 - fração obtida por extração aquosa a temperatura ambiente e precipitada com 3 volumes de etanol;

PC66sol - sub-fração obtida após ressolubilização, diálise e centrifugação da fração PC66;

PC66A; B; C; D - sub-frações eluídas da coluna de exclusão Sepharose 2-B com solução de NaCl 1M, a partir da fração solúvel PC66sol;

PC75m₁; PC66m₁ - frações obtidas após 1 hora de tratamento alcalino;

PC75m₃; PC66m₃ - frações obtidas após 3 horas de tratamento alcalino;

PC66m₃-1; 2; 3; 4 - sub-frações eluídas da coluna de exclusão BIOGEL P-2 com água destilada, a partir da fração PC66B;

CLG - cromatografia líquido-gasosa;

CLG-EM - cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa;

RMN de ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono-13;

DEPT - distortionless enhancement by polarization;

COSY - correlation spectroscopy;

TOCSY - total correlation spectroscopy;

HMQC - heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy;

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

HPLC – cromatografia líquida de alta pressão;

NaNO₃ – nitrito de sódio

D₂O – óxido de deutério;

DMSO – dimetil sulfóxido;

CH₃I – iodeto de metila;

CD₃I – iodeto de metila deuterado;

NaBH₄ – Borohidreto de sódio;

NaBD₄ – Borohidreto de sódio deuterado;

MMB – complexo 4-metil morfolina borano;

TFA – ácido trifluoroacético;

HCl – ácido clorídrico;

CHCl₃ – clorofórmio;

NaHCO₃ - bicarbonato de sódio;

NaOH – hidróxido de sódio;

BaCl₂ – cloreto e bário;

V_t – volume total;

V_o – volume morto;

[α]_D²⁵ – rotação óptica específica;

ppm – partes por milhão;

nd – não determinado.

RESUMO

Porfiranas são polissacarídeos biossintetizados por algas vermelhas pertencentes aos gêneros *Porphyra* e *Bangia*, que apresentam uma estrutura similar a agarose porém mais complexa, devido a ocorrência natural de grupos metil e sulfato. Estes polissacarídeos foram obtidos a partir de *P. columbina* Montagne, por extração aquosa (1,5 p/v) a temperatura ambiente, sendo o extrato seqüencialmente precipitado com etanol 2 (fração PC66) e 3 volumes (fração PC75). Estas frações foram purificadas por cromatografia de exclusão em Sepharose 2B, obtendo-se duas sub-frações homogêneas (PC75B e PC66B) como mostrado por análise de HPSEC-MALLS. Análises de composição monossacarídica, metilação e ^{13}C -RMN mostraram que as frações PC75 e PC66 eram estruturalmente distintas. Enquanto a primeira se mostrou composta por uma porfirana linear típica (NOSEDA, M.D.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R. & CEREZO, A.S., **Carbohydr. Polym.** **42**: 301-305, 2000) a segunda apresentou algumas unidades de β -D-Galp 6-O-substituídas, como identificadas pelo sinal invertido em 68,8 ppm mediante análises em DEPT e metilação (derivado 2,4-di-O-metil-Gal). Após tratamento alcalino, a fração PC66B (NaOH 1M, 80°C, 3h), foi submetida a hidrólise redutiva parcial (0,5M de TFA, 65°C, 8h), rendendo uma mistura de oligossacarídeos, os quais foram purificados por cromatografia de exclusão em BIOGel P-2 (sub-frações PC66m₃-1; 2; 3 e 4) e caracterizados usando espectroscopia de RMN (1 e 2D). As sub-frações PC66m₃-3 e PC66m₃-2 mostraram somente dois sinais na região anomérica, a 102,13 e 102,18 ppm para a primeira e a 102,68 e 102,19 ppm para a segunda, correspondendo as unidades de 6-O-metil- β -D-Galp e β -D-Galp, respectivamente. Os sinais em campo mais alto (invertidos em DEPT) 62,80 e 62,77 ppm foram atribuídos ao C-1 da 3,6-AnGalOH para PC66m₃-3 e PC66m₃-2. Estes resultados junto com os experimentos em 2D mostraram a estrutura dos seguintes oligossacarídeos: [6-O-me- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- α -L-GalOH] e [β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- α -L-GalOH] para PC66m₃-3 e [6-O-me- β -D-Galp-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- α -L-GalOH] para PC66m₃-2. A presença do último oligossacarídeo indica que a fração PC66 contém porfiranas formadas por uma cadeia principal de unidades 3-O-ligadas (β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose) alternadas com unidades 4-O-ligadas (α -L-galactose 6-sulfato e/ou 3,6-anidro- α -L-galactose), parcialmente ramificadas em carbono 6 das unidades de β -D-galactose por 6-O-metil β -D-galactose 4-sulfato, que não haviam sido descritas anteriormente.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ALGAS: ASPECTOS GERAIS

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

As algas são talófitas, isto é plantas ditas inferiores por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas, sendo encontrados desde representantes procarióticos a eucarióticos e unicelulares a pluricelulares (agregados, filamentos ou talos parequimatosos), mas mesmo estas formas multicelulares mostram baixo nível de diferenciação celular, comparado com outros grupos de plantas, com somente as mais evoluídas possuindo tecidos condutores elementares (VAN DEN HOEK *et al.*, 1989).

A variação morfológica entretanto é extremamente diversa e algumas espécies de algas pardas podem atingir dezenas de metros; as algas apresentam tanta variação na reprodução quanto na morfologia, processos vegetativos, assexuais e sexuais estão envolvidos e em muitas formas pode ocorrer alternância de gerações, ao ponto de que a reprodução sexual na divisão Rhodophyta pode ser considerada como a mais complexa do reino vegetal. Muitas das formas unicelulares podem ainda ser móveis, confundindo-se com protozoários (SOUTH & WHITTICK, 1987).

Bioquímica- e fisiologicamente, as algas são similares em muitos aspectos às outras plantas; elas possuem as mesmas vias bioquímicas básicas, todas possuem clorofila *a* como pigmento fotossintético principal, enquanto que os outros tipos de clorofila apresentam uma distribuição mais limitada, funcionando como pigmentos acessórios, bem como os carotenóides (β -caroteno e fucoxantina), a ficocianina e a ficoeritrina; ainda seus carboidratos de reserva e proteínas biossintetizados são comparáveis àqueles das plantas superiores (SOUTH & WHITTICK, 1987).

As algas ocorrem em praticamente todas as condições ambientais na Terra, desde o solo até desertos quentes e frios e todos os tipos de ambientes aquáticos, onde se mostram mais abundantes e representam as maiores produtoras de compostos orgânicos, desempenhando um papel central na base da cadeia alimentar e ainda liberando o oxigênio necessário para o metabolismo dos consumidores (LEE, 1989).

Algumas algas vermelhas e pardas são utilizadas como fonte de alimento humano ou de extratos químicos que são amplamente utilizados na manufatura de alimentos e muitos outros produtos, também podendo representar organismos problema em sistemas de abastecimento de água e em fontes sujeitas a eutrofização. Algumas ainda oferecem riscos de envenenamento como algumas Dinophytas responsáveis pela maré-vermelha (SOUTH & WHITTICK, 1987).

Os carboidratos estruturais das algas (constituintes da parede celular) não são digeridos pelo homem, mas alguns carboidratos solúveis são metabolizados (SOUTH & WHITTICK, 1987). As algas ainda representam excelentes fontes de vitaminas C (equivalente aos frutos cítricos), A, D, B₁, B₁₂

e E, e ainda fornecem todos os elementos traços requeridos para a nutrição humana (SOUTH & WHITTICK, 1987).

Registros fossilíferos mostram que as algas procarióticas representam as primeiras células vegetais fotossintéticas, sendo o grupo de plantas que deu origem as criptogâmicas e mais recentemente as fanerogâmicas (Spermatophytas - SOUTH & WHITTICK, 1987).

1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS

As algas são primariamente classificadas baseando-se em critérios como pigmentos fotossintéticos, natureza química dos produtos de reserva e composição da parede celular, além de outros como: citologia (estrutura fina de organelas como flagelo, núcleo e cloroplastos), morfologia e ciclo de vida; sendo assim reconhecidas 6 divisões, cujos nomes freqüentemente contêm uma referência à cor dos organismos nelas incluídos. Duas delas são procarióticas: Cyanophyta (algas azuis) e Prochlorophyta; e quatro eucarióticas Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas marrons ou pardas), Chlorophyta (algas verdes) e Euglenophyta (RAVEN *et al.*, 1996; SOUTH & WHITTICK, 1987; VAN DEN HOEK *et al.*, 1989).

1.2.1. A DIVISÃO RHODOPHYTA

A divisão Rhodophyta provavelmente representa um dos mais antigos grupos de algas eucarióticas, possui apenas uma única classe, Rhodophyceae, que se divide em duas sub-classes: Bangioideae e Florideae, engloba cerca de

5500 espécies, distribuídas em aproximadamente 600 gêneros, destes, 20 compreendem representantes de água doce e 10 contém plantas unicelulares, os demais gêneros contêm unicamente organismos pluricelulares de ambiente marinho (LEE, 1989; VAN DEN HOEK *et al.*, 1989).

A maioria das algas marinhas são vermelhas e existem mais rodófitas do que todos os outros maiores grupos de algas marinhas combinados, mesmo assim se trata de uma divisão pequena, uma vez que, Compositae, uma mera família de dicotiledôneas contém cerca de 900 gêneros e 20.000 espécies (RAVEN *et al.*, 1996; VAN DEN HOEK *et al.*, 1989).

As macroalgas vivem fixadas a rochas ou ainda sobre substratos calcários, paredes oceânicas ou ainda sobre conchas de moluscos ou sobre outras algas (RAVEN *et al.*, 1996; VAN DEN HOEK *et al.*, 1989). São mais abundantes em regiões quentes, próximas ao equador, onde apresentam tamanho reduzido, mas se estendem até águas mais frias, onde atingem maiores proporções, existindo poucas espécies em regiões polares e sub-polares, onde Phaeophyta e Chlorophyta são mais abundantes (VAN DEN HOEK *et al.*, 1989; LEE, 1989).

Apesar de apresentarem com frequência coloração avermelhada, devido à presença do pigmento fotossintético acessório ficoeritrina no interior dos cloroplastos, também podem se apresentar violeta, marrom ou azul, sendo estas variações de coloração atribuídas a outros pigmentos acessórios que também são encontrados nestas algas como a ficocianina e aloficocianina. As plantas que vivem em regiões mais superficiais são azul-violeta por possuírem maior quantidade de ficocianina; enquanto que plantas de regiões mais profundas são vermelho escuro por possuírem maior quantidade de ficoeritrina

(VAN DEN HOEK *et al.*, 1989; SOTH & WHITTICK, 1987). Caso cresçam em regiões com incidência direta de luz podem ainda apresentar coloração amarelo-marrom ou até mesmo verde, pois a clorofila *a* e os carotenóides (α -caroteno, β -caroteno, luteína e zeaxantina) mascaram as ficobiliproteínas (nome atribuído aos pigmentos acessórios ficocianina e aloficocianina quando associados a proteínas). Quando as algas vermelhas morrem, tendem a tornarem-se verdes, pois as ficobiliproteínas, ao contrário da clorofila, são solúveis em água (VAN DEN HOEK, 1987).

Algumas ordens de Rhodophyta, como Cryptronemiales, Nemalionales e Gigartinales, apresentam ainda calcificação da parede celular, um processo relacionado com as vias de fixação do carbono, onde íons carbonato (CO_3^{2-}) se combinam com íons cálcio (Ca^{2+}) resultando no depósito de carbonato de cálcio (CaCO_3) ao redor da célula ou no meio intracelular (SOTH & WHITTICK, 1987).

Uma estrutura celular especializada denominada de conexões *pit* (“pit plugs”), cuja função parece relacionar-se com o transporte intercelular, é uma das características exclusivas desta divisão e se mostra ausente apenas em poucas ordens de Bangioideae (SOTH & WHITTICK, 1987).

A maioria das algas vermelhas apresenta uma estrutura filamentosa, que cresce a partir de uma única célula apical se dividindo seqüencialmente em segmentos originando um eixo, que por sua vez, forma verticilos de ramos laterais (RAVEN *et al.*, 1996). Poucos gêneros, como *Porphyra*, possuem células justapostas formando lâminas de apenas uma ou duas camadas (RAVEN *et al.*, 1996).

Bangia e *Porphyra* são dois gêneros pertencentes a ordem Bangiales, são quase inteiramente formados por plantas marinhas, existindo alguns representantes de água doce em *Bangia* (VAN DEN HOEK *et al.*, 1989). Possuem como característica distintiva, uma alternância de gerações na reprodução, isto é, uma fase gametofítica (macroscópica), a qual apresenta-se como um talo haplóide sem conexões *pit* e uma fase conchocel (microscópica), que se mostra filamentosa com conexões *pit* (FIGURA 1 - VAN DEN HOEK *et al.*, 1989; LEE, 1989).

As algas vermelhas têm importante papel econômico em países como Chile, Japão, China e Filipinas, principalmente na exploração dos ficocolóides agaranas e carragenanas (RAVEN *et al.*, 1996; VAN DEN HOEK, 1989). Em muitos países orientais, como o Japão, as algas, como as do gênero *Porphyra*, ainda fazem parte da dieta alimentar (RAVEN *et al.*, 1996; VAN DEN HOEK, 1989).

1.3. CARBOIDRATOS DE ALGAS MARINHAS

1.3.1. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA

As algas biossintetizam uma grande variedade de compostos com função de armazenagem, os quais podem apresentar alta ou baixa massa molecular, acumulando-se no citoplasma.

Os verdadeiros compostos de reserva biossintetizados pelas algas são grandes polímeros de glucose relativamente insolúveis. Em Chlorophyta encontra-se um típico amido, como o das plantas superiores, constituído de amilose [cadeia linear α -(1 $\rightarrow$ 4)] e amilopectina [cadeia ramificada α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 6)], armazenados dentro dos cloroplastos na forma de grãos; em Rhodophyta encontra-se o chamado amido das florídeas, uma glucana α -(1 $\rightarrow$ 4) similar a amilopectina e armazenado na forma de grãos citoplasmáticos, enquanto que em Phaeophyta encontra-se uma poliglucana β -(1 $\rightarrow$ 3) denominada de laminarana, que pode apresentar unidades terminais de manitol e alguma ramificação (LEE, 1989; SOUTH & WHITTICK, 1987).

1.3.2 CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR (CBMM)

As macroalgas biossintetizam, além destes polissacarídeos de reserva, carboidratos de baixa massa molecular (heterosídeos, digeneasídeo e sacarose) e poliois (manitol, dulcitol e sorbitol) os quais em muitos casos podem representar os principais produtos fotossintéticos. As algas vermelhas (Divisão Rhodophyta) por exemplo, biossintetizam carboidratos de baixo peso

molecular (florideosídeo, isoflorideosídeo, digeneasídeo) e poliois (sorbitol e dulcitol) enquanto que as algas verdes (Divisão Chlorophyta) e pardas (Divisão Phaeophyta) produzem principalmente sacarose e manitol, respectivamente (KARSTEN *et al.*, 1991).

Os carboidratos de baixa massa molecular (CBMM) são principalmente heterosídeos de galactose e glicerol denominados: florideosídeo [α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerol] e isoflorideosídeos da 'forma D' [α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1)-D-glicerol] e 'forma L' [α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1)-L-glicerol] (MENG *et al.*, 1987), produzidos por todas as ordens de Rhodophyta exceto pela ordem Ceramiales, a qual produz digeneasídeo, o qual é formado por α -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato e que se mostram restritos a este grupo (KIRST, 1980) - FIGURA 2.

Tais CBMM e poliois possuem atividade osmorreguladora, funcionando como osmólitos ou solutos compatíveis, tendo efeito estabilizante em enzimas, membranas e em estruturas de macromoléculas sob condições de hipersalinidade, mostrando-se acumulados no citoplasma celular (KARSTEN *et al.*, 1991 e 1999).

Os poliois são formados a partir de unidades monossacarídicas reduzidas, constituindo dessa maneira poliálcoois de D-manose, D-glucose e D-galactose (D-manitol, D-sorbitol e dulcitol, respectivamente - FIGURA 3), possuindo como principal função a manutenção dos níveis das pressões osmótica e de turgor, embora este mecanismo ainda não seja conhecido. Sacarose possui função estabilizadora em membranas após dessecação e osmorregulação (CROWE *et al.*, 1987).

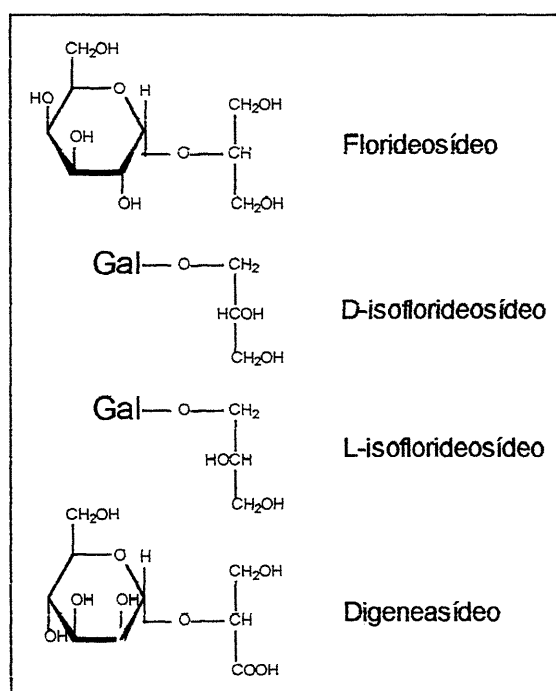


FIGURA 2: Estrutura química dos florideosídeos, Isoflorideosídeos (formas D e L) e digeneasídeo, os carboidratos de baixa massa molecular presentes nas algas pertencentes a divisão Rhodophyta.

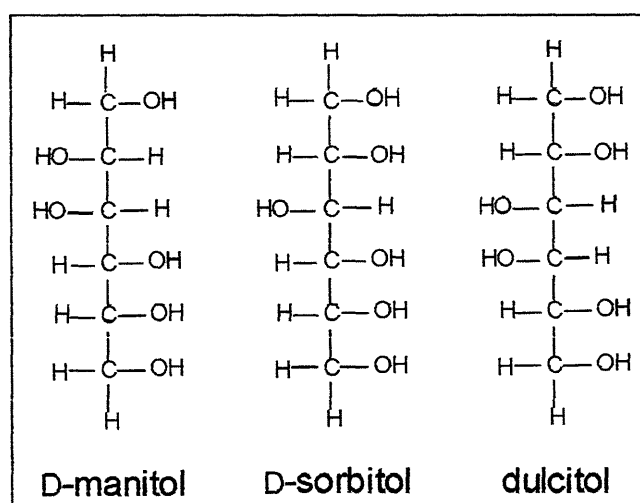


FIGURA 3: Estrutura apresentada pelos polialcoois D-manitol, D-sorbitol e dulcitol encontrados em diferentes grupos de algas vermelhas.

Os CBMM são ainda muito úteis nas algas vermelhas como critério taxonômico e filogenético, quando associado a outros caracteres, tais como: morfologia, genética, ultraestrutura, desenvolvimento e ciclo de vida (KARSTEN *et al.*, 1993).

Em geral para que um componente orgânico seja útil como marcador na sistemática é necessário que este seja específico de um certo taxon ou grupo de organismos e que seja suficientemente abundante para ser detectado e identificado com segurança (KARSTEN *et al.*, 1993). Desta maneira, os carboidratos de baixa massa molecular sintetizados durante a fotossíntese por diferentes algas têm sido considerados como um promissor caráter quimiotaxonômico; por exemplo, o heterosídeo florideosídeo é considerado ser o principal produto fotossintético e de reserva em todas as ordens de Rhodophyta, exceto em Ceramiales, onde em geral, os membros deste grupo sintetizam e acumulam digeneasídeo. Membros da ordem Bangiales como *Porphyra* e *Bangia* contêm em adição aos florideosídeos, as 2 formas isoméricas de isoflorideosídeo: D-isoflorideosídeo e L-isoflorideosídeo, sendo estes os únicos gêneros de macroalgas conhecidos que biossintetizam uma ou ambas as formas isoméricas de isoflorideosídeo (KARSTEN *et al.*, 1993).

Embora a distribuição destes diferentes glicosídeos em ordens de algas vermelhas tenha sido considerado como quimiotaxonomicamente útil, recentemente tem-se demonstrado que alguns gêneros de Ceramiales produzem e acumulam florideosídeo e não digeneasídeo; outras exceções bioquímicas são relatadas em Bostrychioideae (Ceramiales, Rhodomelaceae), taxon caracterizado por sintetizar os polialcoois sorbitol e dulcitol, componentes não muito comuns em algas vermelhas e no gênero *Caloglossa* (Ceramiales,

Delesseriaceae) onde o principal carboidrato de baixa massa molecular sintetizado é o manitol (KARSTEN *et al.*, 1999), componente este utilizado como marcador quimiotaxonômico de algas pardas.

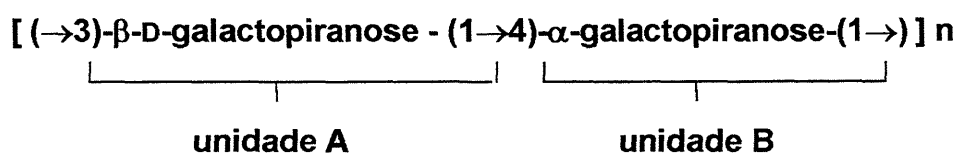
1.3.3. POLISSACARÍDEOS ESTRUTURAIS DA PAREDE CELULAR

A parede celular das algas eucarióticas é composta por dois componentes principais, um denominado fibrilar, o qual forma o esqueleto da parede, e outro denominado amorfo, o qual forma uma matriz na qual o fibrilar se encontra embebido (LEE, 1989; KLOAREG & QUATRANO, 1988).

O tipo mais comum de componente fibrilar é a celulose, um polímero de D-glucose com ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), porém em Rhodophyta, nos gêneros *Porphyra* e *Bangia*, na fase macroscópica (gametofítica) o componente fibrilar é formado por uma trama de xilanas com ligações β -(1 $\rightarrow$ 3) ou de D-mananas com ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), estando a celulose, nestes dois gêneros, restrita unicamente a fase microscópica (conchoceles - KLOAREG & QUATRANO, 1988). O componente amorfo é sintetizado no complexo de Golgi e transportado até a membrana através de vesículas, pode compreender até 70% do peso seco da parede celular, e possuir uma composição variada (KLOAREG & QUATRANO, 1988). Na divisão Rhodophyta corresponde às galactanas sulfatadas, comercialmente exploradas, agarana e carragenana, sendo estes componentes os responsáveis por conferir flexibilidade e resistência à estrutura vegetal (RAVEN *et al.*, 1996; VAN DEN HOEK *et al.*, 1989; SOTH & WHITTICK, 1987; LEE, 1989; KLOAREG & QUATRANO, 1988).

1.3.3.1. AS GALACTANAS SULFATADAS

As galactanas sulfatadas biossintetizadas pelas algas vermelhas (Divisão Rhodophyta), apresentam como característica única, uma estrutura linear formada por unidades de β -D-galactopiranosose substituídas glicosidicamente nos carbonos 1 e 3 (unidade A) e de α -galactopiranosose substituídas nos carbonos 1 e 4 (unidade B), mostrando ainda um arranjo alternante repetitivo:



A unidade B pode apresentar-se sob duas diferentes configurações enantioméricas: se pertencente a série D- estas galactanas são ditas pertencer ao grupo das carragenanas, se pertencente a série L-, ao grupo das agaranas, ainda alguns polissacarídeos podem apresentar a unidade B em ambas as configurações enantioméricas (D- e L-) sendo então denominados de carrágar ou híbridos D/L (PAINTER, 1982; USOV, 1998).

A estrutura alternante característica destes biopolímeros, pode mostrar-se mais complexa, devido a ocorrência de grupos substituintes em diferentes posições em cada uma das unidades:

- grupo metil éster em carbono 6 da unidade A;
- grupo metil éster em carbono 2 da unidade B;
- grupo acetal de ácido pirúvico [4,6-O-(1-carboxietilideno)] envolvendo os carbonos 4 e 6 da unidade A;

- grupo éster sulfato em carbono 2, 4 ou 6 da unidade A;
 - grupo éster sulfato em carbono 2 ou 6 ou em ambos da unidade B;
- a unidade B pode ainda encontrar-se parcialmente ou totalmente convertida a forma anidro correspondente 3,6-anidro- α -galactopirranose (PAINTER, 1982).

1.3.3.1.1. As carragenanas

As carragenanas apresentam uma estrutura linear repetitiva de unidades de β -D-galactopirranose (unidade A) e α -D-galactopirranose (unidade B – FIGURA 4), a qual pode mostrar-se “mascarada” devido a ocorrência de grupos sulfato, que podem esterificar os carbonos 2, 4 e/ou 6 das unidades A e 2 e/ou 6 das unidades B, e de unidades de 3,6-anidro- α -D-galactose (PAINTER, 1982; USOV, 1998).

Assim, as carragenanas constituem uma família de biopolímeros, caracterizados por um alto grau de sulfatação e pela baixa ocorrência de grupos metil e acetal de ácido pirúvico, que são sintetizados a partir de diferentes espécies de algas vermelhas, sendo classificadas e agrupadas de acordo com a distribuição dos grupos sulfato na unidade A (PAINTER, 1982).

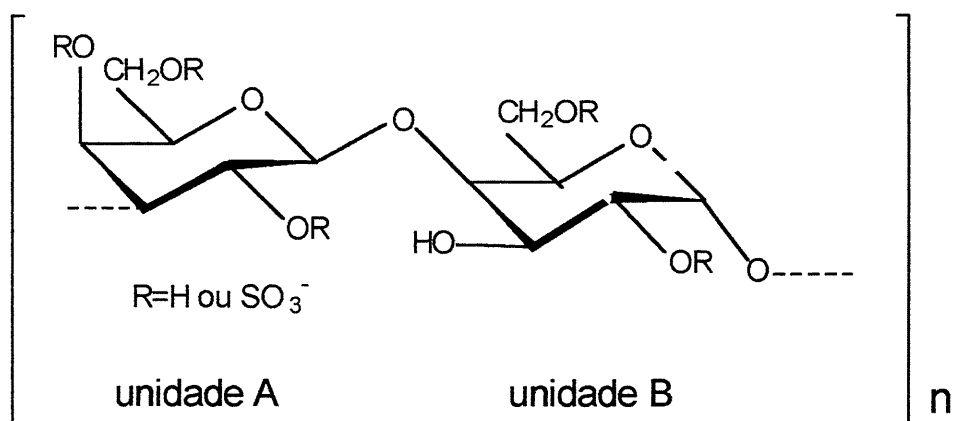


FIGURA 4: Estrutura básica repetitiva apresentada pelas carragenanas.

Quatro grupos principais e distintos de carragenanas podem ser mencionados: *Kappa*, *Lambda*, *Beta* e *Omega*.

O grupo *Kappa* inclui aquelas carragenanas que se mostram insolúveis, ou seja, que geleificam, em solução de KCl 0,25M ou o fazem após modificação química (tratamento alcalino), a este grupo pertencem a *kappa*-carragenana (κ -carragenana) a qual é formada por β -D-galactose 4-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactose, a *iota*-carragenana (ι -carragenana) formada por unidades de β -D-galactose 4-sulfato e por 3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato, a *mi*-carragenana (μ -carragenana) formada por β -D-galactose 4-sulfato e α -D-galactose 6-sulfato e a *ni*-carragenana (ν -carragenana), formada por β -D-galactose 4-sulfato e galactose 2,6-dissulfato (GREER *et al.*, 1984).

LAWSON & REES (1970) verificaram que a *mi*-carragenana correspondia ao precursor biológico da *kappa*-carragenana, enquanto que a *ni*-carragenana ao da *iota*-carragenana.

O grupo *Lambda* inclui aquelas que se mostram solúveis em KCl ou geleificam a elevadas concentrações deste sal, a este grupo pertencem a *Lambda*-carragenana (λ -carragenana) a qual é formada por β -D-galactose 2-sulfato e α -D-galactose 2,6-dissulfato, a *epson*-carragenana (ξ -carragenana) formada por β -D-galactose 2-sulfato e α -D-galactose 2-sulfato, a *pi*-carragenana (π -carragenana) formada por 4,6-O-(1-carboxietilideno) β -D-galactose 2-sulfato e α -D-galactose 2-sulfato e a *teta*-carragenana (θ -carragenana) formada por β -D-galactose 2-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato (GREER & YAPHE, 1984).

As proporções relativas destes dois grupos de carragenanas variam de acordo com a fase do ciclo de vida, a fase tetraesporofítica contém maior proporção de λ -carragenanas, enquanto que a gametofítica contém maior proporção de κ -carragenanas (LEE, 1989).

O grupo *Omega*, inclui aquelas carragenanas que possuem a unidade A sulfatada em carbono 6 (β -D-galactose 6-sulfato) e a unidade B também sulfatada no mesmo carbono (α -D-galactose 6-sulfato), denominada *phi*-carragenana (ϕ -carragenana) ou substituída por 3,6-anidro- α -D-galactose, denominada omega-carragenana (ω -carragenana) (GREER & YAPHE, 1984).

Por último, o grupo das *Beta*-carragenanas, caracteriza-se por englobar aquelas desprovidas de grupo sulfato na unidade A, isto é, formadas unicamente por β -D-galactose e 3,6-anidro- α -D-galactose (β -carragenana), esta última podendo estar sulfatada em carbono 2, 3,6-anidro α -D-galactose 2-sulfato (α -carragenana) ou como seu precursor biológico α -D-galactose 6-

sulfato (γ -carragenana) ou α -D-galactose 2,6-dissulfato (δ -carragenana) (GREER & YAPHE, 1984).

TABELA 1: Classificação das carragenanas de acordo com a distribuição dos grupos sulfato nas unidades A e B (GREER & YAPHE, 1984).

FAMÍLIA	3-O- β -D-galactose	4-O- α -D-galactose
	Unidade A	Unidade B
Kappa		
κ	4-sulfato	3,6-anidrogallactose
ι	4-sulfato	3,6-anidrogallactose 2-sulfato
μ	4-sulfato	6-sulfato
ν	4-sulfato	2,6-dissulfato
Lambda		
λ	2-sulfato	2,6-dissulfato
ξ	2-sulfato	2-sulfato
π	2-sulfato; 4,6-(1-carboxietilideno)	2-sulfato
θ	2-sulfato	3,6-anidrogallactose 2-sulfato
Beta		
β	-	3,6-anidrogallactose
α	-	3,6-anidrogallactose 2-sulfato
γ	-	6-sulfato
δ	-	2,6-dissulfato
Omega		
ω	6-sulfato	3,6-anidrogallactose
ϕ	6-sulfato	6-sulfato

As carragenanas são mais abundantemente obtidas a partir dos gêneros *Gigartina*, *Eucheuma* e *Hypnea*, sendo as espécies produtoras de carragenanas denominadas de carragenófitas. As carragenanas são utilizadas

industrialmente como agentes geleificantes ou espessantes em diversas áreas da indústria, como tintas, alimentos, cosméticos e fármacos (LEE, 1989).

1.3.3.1.2. As agaranas

As agaranas apresentam uma estrutura linear repetitiva de unidades de β -D-galactopirranose (unidade A) e α -L-galactopirranose (unidade B), caracterizadas por uma alta ocorrência de grupos acetal de ácido pirúvico e metil (USOV, 1998). Este último ocorrendo principalmente em carbono 6 da unidade A e/ou carbono 2 da unidade B, mas também podendo ser encontrado em carbono 2, 4 e/ou 6 da unidade A e 2 e/ou 6 da unidade B, e ainda pela baixa ocorrência de grupos sulfato, que podem ocorrer esterificando os carbonos 2, 4 e/ou 6 das unidades A e 2 e/ou 6 das unidades B, unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose ocorrem em altas percentagens, grupos glicosil também podem estar presentes (USOV, 1998 – FIGURA 5).

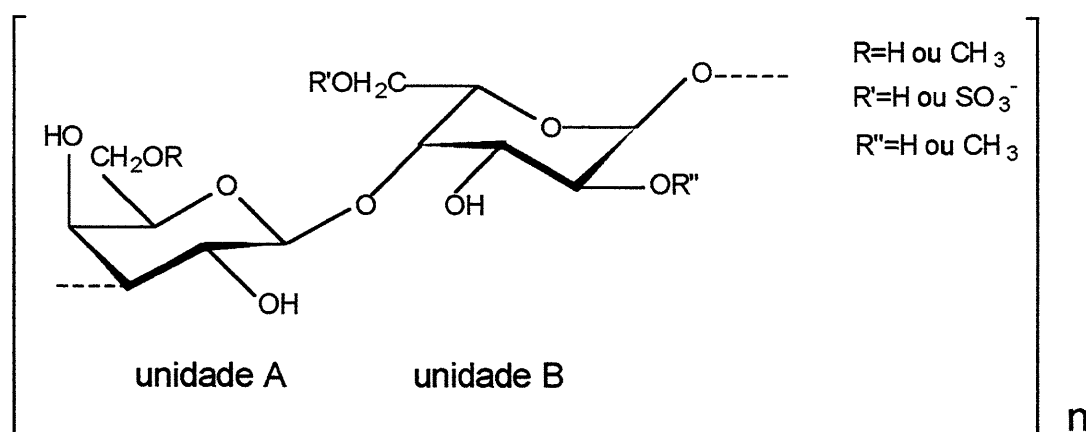


FIGURA 5: Estrutura básica repetitiva apresentada pelas agaranas.

As agaranas são classificadas e agrupadas de acordo com a presença ou ausência de grupos ácidos, como sulfato ou acetal de ácido pirúvico, em 3 tipos:

- agarose, que se mostra linear e regular, constituída por unidades alternantes de (1→3) β -D-galactose (unidade A) e (1→4) 3,6-anidro- α -L-galactose (unidade B) em quantidades equimolares;
- agarpectina, que contém, em adição aos resíduos presentes na agarose, unidades de β -D-galactose contendo grupos acetal de ácido pirúvico [4,6-O-(1-carboxietilideno)] além de uma alta proporção de grupos éster-sulfato, assim distinguindo-se dois tipos:
 - agarose piruvatada, que se mostra fracamente sulfatada, porém altamente piruvatada e rica em unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose;
 - galactana sulfatada, a qual apresenta-se rica em grupos sulfato, porém fracamente piruvatada e pobre em unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose (PAINTER, 1982; ASPINALL, 1970).

As agaranas são obtidas comercialmente a partir de espécies de *Gelidium*, *Pterocladia* e *Gracilaria*, sendo as espécies produtoras de agaranas referidas como agarófitas. O Japão é o maior produtor mundial de agaranas, as quais são amplamente utilizadas na alimentação e tecnologia: indústria farmacêutica (estabilizante de emulsões, constituinte de cosméticos e cápsulas de drogas), laticínios (como espessantes e geleificante) e para uso laboratorial como meio de cultura e como matriz para cromatografia e gel de eletroforese (LEE, 1989).

1.3.3.1.3. As porfiranas

Porfirana é o nome genérico dado as galactanas sulfatadas biossintetizadas por algas dos gêneros *Porphyra* e *Bangia*; é estruturalmente semelhante a agarose, porém mais complexa, devido à ocorrência natural de radicais metil, esterificando o carbono 6 de algumas unidades de β -D-galactose e de grupos sulfato, também esterificando o carbono 6, porém de unidades de α -L-galactose em substituição à algumas unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose, resultando numa estrutura repetitiva “mascarada” (ASPINALL, 1970; ANDERSON & REES, 1965 – FIGURA 6).

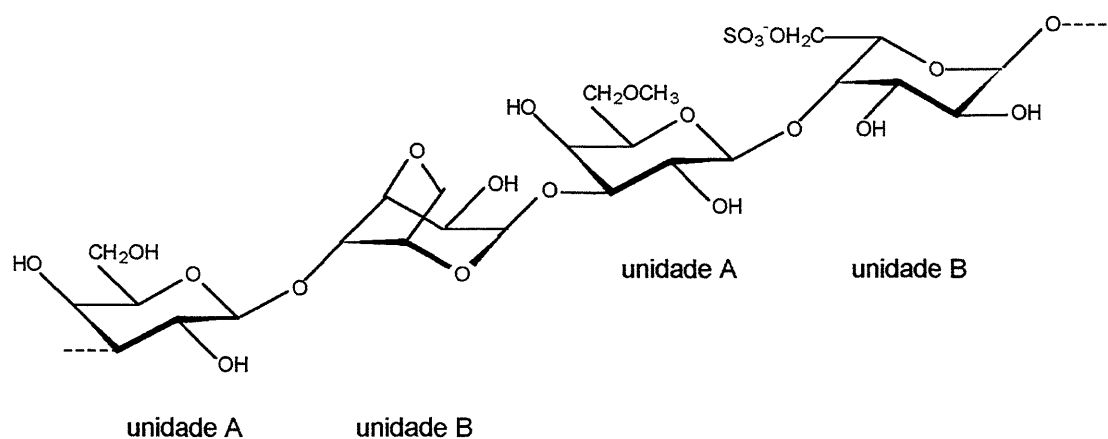


FIGURA 6: Estrutura repetitiva “mascarada” apresentada pelas porfiranas.

A origem deste tipo de estrutura pode ser explicado como resultado da biossíntese das galactanas sulfatadas, do primeiro passo biossintético provavelmente resulta uma cadeia linear e regular de unidades de galactose, o passo seguinte consiste na sulfatação do carbono 6 da unidade B e o último na

eliminação do sulfato desta posição nos resíduos de galactose 4-O-substituídos para formação do anel 3,6-anidro (McCANDLESS, 1979; USOV, 1984). Caso o segundo e o terceiro passo ocorram completamente e especificamente, eles resultam em estruturas ditas ideais, mas se forem incompletos ou acompanhados pela adição de grupos metil ou sulfato resultam numa estrutura mascarada (McCANDLESS, 1979; USOV, 1984).

As porfiranas extraídas da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne foram estudadas anteriormente por BRASCH *et al.*, 1981 e por VILLARROEL & ZANLUNGO, 1981. Tais autores a caracterizaram como uma galactana sulfatada de cadeia linear, com unidades alternantes de β -D-galactose (15,5 – 17,9%) ou 6-O-metil β -D-galactose (29,9 – 36,0% - unidade A) substituídas glicosidicamente em carbono 3 e de α -L-galactose 6-sulfato (29,4 – 31,4%) ou 3,6-anidro- α -L-galactose (16,3 – 25,2% - unidade B) substituídas glicosidicamente em carbono 4. Nenhum grupo sulfato foi detectado esterificando qualquer outro carbono no polissacarídeo, que não o carbono 6, bem como grupos acetal de ácido pirúvico, que também se mostraram ausentes (BRASCH *et al.*, 1981; VILLARROEL & ZANLUNGO, 1981). Estes mesmos autores ainda mencionaram a possibilidade de ramificação na cadeia, em carbono 3 ou 4, a qual não foi confirmada.

Conforme descrito anteriormente, as galactanas, embora obedeçam a uma mesma unidade estrutural comum (β -D-galactose 3-O-substituída e α -galactose 4-O-substituída), apresentam grande heterogeneidade no grau e tipo de substituições que implicam em propriedades físico-químicas e biológicas diferentes. Deste modo, o estudo da estrutura química fina de polissacarídeos

de algas vermelhas, é de grande importância na correlação entre suas estruturas e possíveis aplicações, industriais e/ou biológicas.

Devido à ocorrência de grupos sulfato e de unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose nos polissacarídeos de algas vermelhas, algumas metodologias especiais são adotadas no estudo destes carboidratos, as quais serão descritas a seguir.

1.4. HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL

A unidade monossacarídica 3,6-anidrogallactose, encontrada unicamente em polissacarídeos de algas vermelhas, se mostra muito lábil em meio ácido, como já mencionado anteriormente, sendo assim facilmente degradada em condições normais de hidrólise. Por esse motivo torna-se necessário a utilização de um método hidrolítico mais adequado que evite a degradação dessas unidades. STEVENSON e FURNEAUX (1991) desenvolveram um método hidrolítico denominado hidrólise redutiva, onde juntamente ao ácido trifluoracético acrescenta-se um agente redutor estável em meio ácido, o complexo borano-4-metil morfolina. Durante uma pré-hidrólise que ocorre em condições mais brandas, a 80°C durante 15 minutos, somente as ligações 3,6-anidrogallactosídicas são hidrolisadas, por serem mais lábeis, e as unidades monossacarídicas livres são imediatamente reduzidas à unidades de 3,6-anidrogallactitol no meio, adquirindo maior estabilidade. Em seguida processa-se a hidrólise das demais unidades constituintes do polissacarídeo, a 120°C

durante 90 minutos, e a redução das mesmas. Desta forma é possível quantificar ao mesmo tempo todos os açúcares presentes no polissacarídeo.

1.5. OLIGOSSACARÍDEOS E HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

Oligossacarídeos são naturalmente encontrados em vegetais como produtos de seu metabolismo normal podendo exercer diversas funções, desde estruturais até como compostos de reserva e, ainda, função osmorreguladora como a sacarose, o oligossacarídeo de maior ocorrência em vegetais (CROWE *et al.* 1987; KANDLER & HOPF, 1980).

Tais oligossacarídeos podem ser biossintetizados naturalmente no vegetal a partir de monossacarídeos ou oligossacarídeos presentes ou de um doador glicídico pela ação de enzimas específicas denominadas de glicosiltransferases, recebendo deste modo a denominação de oligossacarídeos primários, ou seja aqueles sintetizados *in vivo* (KANDLER & HOPF, 1980). Oligossacarídeos secundários são aqueles que têm a sua origem atribuída à hidrólise parcial de outros açúcares, como oligossacarídeos maiores, polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos, por ação enzimática, tanto *in vivo* como *in vitro* (glicosidases e hidrolases), como por catálise ácida *in vitro* (KANDLER & HOPF, 1980).

A caracterização de oligossacarídeos obtidos *in vitro*, tanto por hidrólise ácida parcial como enzimática, é um método muito útil e amplamente utilizado para auxiliar na determinação estrutural dos polissacarídeos a eles relacionados, pois fornece informações importantes como sequência e

configuração anomérica das unidades monossacarídicas constituintes e confirmação dos tipos de ligação glicosídica (ASPINALL, 1982).

MORRICE *et al.* (1983) e USOV & IVANOVA (1987) utilizaram uma β -agarase de origem bacteriana para obter oligossacarídeos por meio de hidrólise enzimática, com a finalidade de elucidar a estrutura química das agaranas isoladas de *Porphyra umbilicalis* e de *Plsiphonia morrowii*. Hidrólises enzimáticas são altamente específicas, uma vez que tanto hidrolases como glicosidases apresentam-se altamente específicas por determinadas unidades monossacarídicas e por sua configuração anomérica, a β -agarase por exemplo, cliva especificamente as ligações β -D-galactopiranosídicas da agarose, liberando assim neoagarobiose (3,6-anidro- α -L-galactopiranosose-(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactopiranosose) ou outros oligossacarídeos maiores (ASPINALL, 1982).

A hidrólise ácida parcial é processada de forma similar à uma hidrólise convencional, amenizando-se apenas algumas de suas condições, tais como temperatura, tempo ou concentração ácida. Por este método, polissacarídeos que apresentem um único padrão de ligação glicosídica ou vários, porém com uma mesma susceptibilidade à clivagem, darão origem à uma seleção representativa de todos os oligossacarídeos possíveis (ASPINALL, 1982). Na prática, contudo, verifica-se que a taxa de hidrólise de diferentes ligações glicosídicas é com frequência suficientemente diferente para que nem todos os possíveis oligossacarídeos possam ser isolados a partir de um único método de despolimerização, rendendo assim misturas de açúcares de relativa baixa massa molecular junto com, em alguns casos, fragmentos de alta massa molecular (ASPINALL, 1982).

Os produtos da hidrólise ácida parcial (mono, di e oligossacarídeos) antes de serem caracterizados devem ser primeiramente fracionados, para tanto, uma variedade de procedimentos cromatográficos podem ser utilizados, incluindo cromatografia de partição em celulose, cromatografia de adsorção em carvão (onde os oligossacarídeos são progressivamente separados com água contendo proporções crescentes de etanol), cromatografia de troca iônica ou gel filtração (ASPINALL, 1982).

USOV & ELASHVILI (1991) e STEVENSON & FURNEAUX (1991) têm introduzido nas análises estruturais de galactanas de algas vermelhas, uma variação da hidrólise redutiva convencional para a obtenção de oligossacarídeos. Eles mostraram que durante uma hidrólise total, polissacarídeos contendo unidades de 3,6-anidrogactose sofrem uma redução quantitativa destes monossacarídeos, pouco resistentes ao meio ácido, enquanto que os demais monossacarídeos permanecem quantitativamente inalterados.

Como mencionado anteriormente, a hidrólise redutiva permite uma estimativa simultânea das unidades 2-O-metil-3,6-anidrogactose, 3,6-anidrogactose e todos os outros monossacarídeos de uma amostra usando cromatografia líquido-gasosa (CLG).

Na hidrólise redutiva parcial, o meio hidrolítico contendo o complexo borano-4-metil morfolina (4-MMB), um agente redutor estável em meio ácido, favorece a clivagem seletiva das ligações 3,6-anidrogactosídicas e a concomitante redução destas unidades, rendendo desta maneira oligossacarídeos contendo, unicamente, 3,6-anidrogactitol como unidade terminal. Por exemplo, a hidrólise parcial da agarose resulta unicamente no

dissacarídeo agarobiitol, enquanto que de carragenanas contendo 3,6-anidrogactose resulta carrabiitol e/ou seus mono e dissulfatos (FIGURA 7 - USOV, 1998). Tais oligossacarídeos reduzidos se mostram estáveis e mais convenientes para separação por cromatografia do que os produtos de hidrólise ácida ou metanólise, sendo que suas estruturas e posição de grupos sulfato podem ser esclarecidas usando RMN de ^{13}C (USOV & ELASHVILI, 1991).

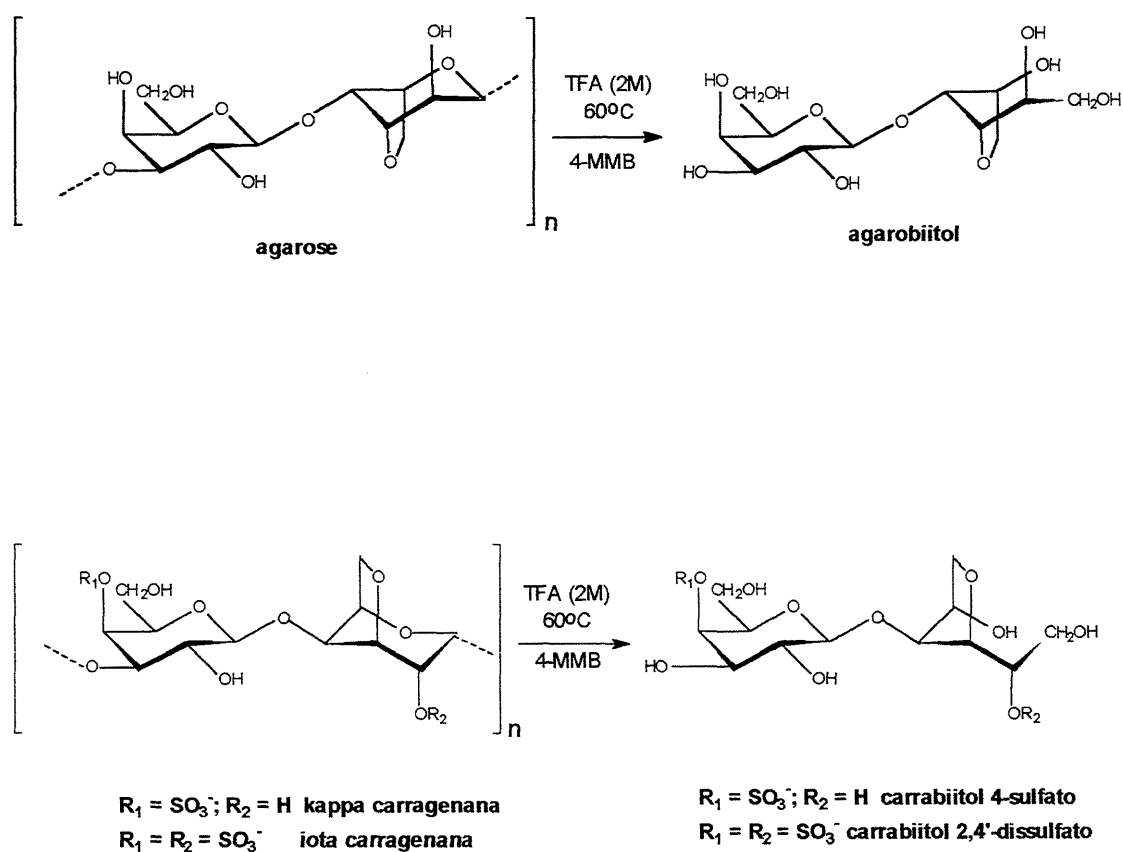


FIGURA 7: Produtos de hidrólise redutiva parcial obtidos a partir da agarose e de carragenanas contendo 3,6-anidrogactose (USOV, 1998).

1.6. TRATAMENTO ALCALINO

O tratamento alcalino consiste num método químico de obtenção de unidades monossacarídicas 3,6-anidrogalactose, a partir de unidades de galactose-6-sulfato precursoras presentes no polissacarídeo, por meio de uma reação de ciclização (FIGURA 8).

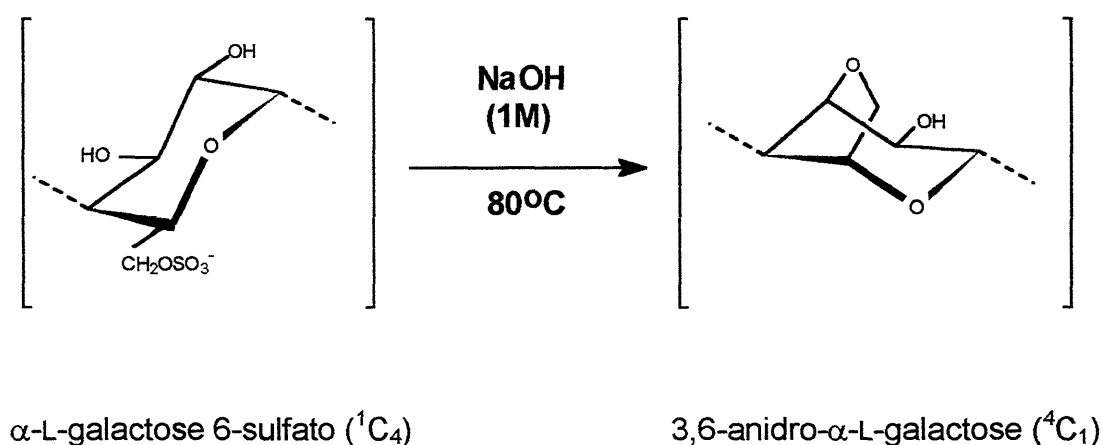


FIGURA 8: Reação de ciclização em galactanas do tipo agarana: transformação das unidades de $\alpha\text{-L-galactose 6-sulfato (} ^1\text{C}_4 \text{)}$ em 3,6-anidro- $\alpha\text{-L-galactose (} ^4\text{C}_1 \text{)}$, em meio alcalino.

O tratamento alcalino é utilizado laboratorialmente para se determinar quantitativamente as unidades de $\alpha\text{-galactose 6-sulfato}$ através da diferença na percentagem de sulfato presente na amostra antes e após o tratamento. A reação

de ciclização ocorre sob temperatura (80°C) e na presença de álcali (NaOH 1M). Para impedir a degradação do polissacarídeo reduz-se sua extremidade redutora com NaBH_4 , um agente redutor estável em meio básico, antes da

adição da base e após, para reduzir as extremidades redutoras que possam se formar durante o tratamento alcalino. A ciclização ocorre mediante a liberação do grupo sulfato (grupo abandonador), por um processo de substituição, sob catálise básica e a concomitante formação do anel 3,6-anidro. A eliminação é acompanhada por inversão da configuração do átomo de carbono ao qual estava unido (reação de substituição nucleofílica bimolecular, S_N2). Como resultado desta reação os resíduos de α -galactose passam de uma conformação 4C_1 para 1C_4 em carragenanas (D-galactose) e de 1C_4 para 4C_1 em agaranas e porfiranas (L-galactose). A troca da conformação além de facilitar a ciclização por aproximar o oxigênio em C-3 e o sulfato em C-6, que passam a se encontrar em posições cis diaxiais favorecendo o ataque nucleofílico. Também promove um aumento do poder geleificante do polissacarídeo como resultado da aquisição de uma conformação helicoidal da molécula. A reação somente ocorrerá com as unidades de α -galactose que possuírem sulfato no carbono 6 e a hidroxila em carbono 3 livre, estando a velocidade de reação sob controle da temperatura, do tempo de reação e das concentrações de álcali e polissacarídeo (CIANCIA, 1994).

1.7. METILAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

A metilação é uma das técnicas mais antigas para a determinação da estrutura de polissacarídeos e continua sendo utilizada amplamente até o presente. Embora existam vários métodos todos baseiam-se no mesmo mecanismo: formação do alcóxido pela presença de álcali no meio de reação, e a adição de um agente metilante (sulfato de dimetila ou iodeto de metila) o qual

sofre um ataque nucleofílico do alcóxido para completar a eterificação das hidroxilas livres. Portanto, a formação do alcóxido é de fundamental importância para obter uma metilação completa do polissacarídeo (NOSEDA, 1994).

CIUCANU & KEREK (1984) realizaram o processo de metilação em polissacarídeos neutros utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, NaOH pulverizado e iodeto de metila. A necessidade de se utilizar DMSO se deve ao fato deste ser um solvente aprótico, que não apresenta hidrogênio ácido, e solubiliza tanto reativos orgânicos como inorgânicos. Porém, este método se mostra pouco eficiente para polissacarídeos altamente carregados como é o caso dos polissacarídeos sulfatados, devido a sua baixa solubilidade em DMSO, dificultando assim a interação dos reativos com o polissacarídeo. Outros fatores também influenciam, dificultando a metilação rápida e total nos polissacarídeos sulfatados, entre eles:

1. Ionização incompleta dos grupos hidroxilas devido a presença próxima de grupos sulfato ionizados;
2. Impedimento estérico, devido ao volume dos grupos sulfato, o que, também, dificulta a ionização de grupos hidroxila vicinais.

Para contornar o problema da baixa solubilidade de galactanas sulfatadas em DMSO, STEVENSON & FURNEAUX (1991) converteram os polissacarídeos que geralmente se encontram na forma de sal de sódio ou de potássio em sal orgânico (triethylamônio) por meio de diálise contra uma solução de trietilamina, permitindo dessa maneira sua metilação direta devido a sua solubilidade em DMSO. STORTZ & CEREZO (1993) prepararam

polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio utilizando resina catiônica (forma trietilamônio), um método mais rápido e eficiente que o anterior.

1.8. MECANISMO DE FORMAÇÃO DE GÉIS

A habilidade de formar géis e soluções viscosas é uma característica própria de algumas galactanas de algas vermelhas, tais como as carragenanas, as agaranas e as porfiranas. Esta capacidade está diretamente relacionada com a conformação estrutural do polissacarídeo (USOV, 1984).

O mecanismo de formação de géis, ocorre através da associação de moléculas em duplas hélices, a associação ocorre entre cadeias polissacarídicas com longas seções regulares, interrompidas por outras sem nenhum tipo de regularidade. Em condições favoráveis, geralmente por resfriamento, as cadeias polissacarídicas adquirem uma conformação em dupla hélice entre as regiões repetitivas da molécula, se interrompendo nas zonas irregulares, permitindo a interação e a formação de duplas hélices com outra cadeia, formando as denominadas zonas de união (REES, 1969; USOV, 1984).

A presença de unidades de 3,6-anidrogactose são necessárias para a formação do gel, pois sua conformação 1C_4 com ligações glicosídicas equatoriais (C-4 e C-1) difere das demais unidades que apresentam conformação 4C_1 e ligações glicosídicas axiais (C-4 e C-1), sendo responsáveis por um desvio na direção da cadeia, permitindo a aquisição de uma estrutura helicoidal. Portanto, a geleificação se deve a formação de uma rede tridimensional, sendo em alguns casos ainda, necessária a presença de cátions

específicos, os quais neutralizam a repulsão entre os grupos sulfato presentes nas cadeias formadoras das duplas hélices (REES, 1969).

1.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As unidades de 3,6-anidro galactose podem ser produzidas naturalmente na alga através de vias enzimáticas específicas (ZINOUN *et al.*, 1997) ou quimicamente em laboratório ou na indústria de ficocolóides, mediante tratamento alcalino (CIANCIA, 1994), a partir de unidades precursoras de galactose 6-sulfato.

A cinética química da reação de ciclização foi estudada utilizando-se carragenanas pertencentes as famílias *kappa* (*mi-ni* carragenana) e *lambda* por CIANCIA *et al.* (1993) e NOSEDA (1994) e oligossacarídeos sulfatados obtidos a partir da autohidrólise de *lambda* carragenana por NOSEDA & CEREZO (1995). Tais estudos mostraram que em *Lambda* a velocidade de reação é cerca de 20 a 60 vezes mais lenta do que em *kappa*, tais resultados mostraram-se relacionados a diferenças estruturais apresentadas entre estas carragenanas (quantidade e distribuição de grupos sulfato).

Mais recentemente NOSEDA *et al.* (2000)^b estudaram esta cinética em galactanas sulfatadas do tipo agaranas, utilizando para tanto uma fração polissacarídica, denominada PC75, isolada a partir da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne, a qual mostrou-se caracteristicamente constituída por porfiranas lineares típicas, e com uma velocidade de reação intermediária à *mi-ni* e *lambda*.

Da mesma alga isolou-se também uma segunda fração denominada de PC66, a qual continha polissacarídeos que, por análises prévias, mostraram-se

estruturalmente distintos daqueles presentes na fração PC75. Desta maneira, essa foi reservada para análises mais detalhadas e constitui assim o objeto de estudo desta dissertação de mestrado.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo geral elucidar a estrutura química apresentada pelas galactanas sulfatadas (porfiranas) biossintetizadas pela alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne, utilizando-se de métodos químicos e espectroscópicos;

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Purificar as porfiranas obtidas a partir de extração aquosa da alga *P. columbina*;
- 2- Identificar e quantificar os monossacarídeos encontrados nestes polímeros;
- 3- Purificar e caracterizar a estrutura dos oligossacarídeos quimicamente obtidos, no intuito de elucidar a estrutura química fina apresentada pelos polissacarídeos nativos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Neste trabalho estudou-se os polissacarídeos extraídos da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne:

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Subclasse: Bangioideae

Ordem: Bangiales

Família: Bangiaceae

Gênero: *Porphyra*

Espécie: *Porphyra columbina* Montagne.

Os exemplares da alga foram coletados em Comodoro Rivadavia (Província de Chubut) Argentina. Após retirados do mar, foram lavados com água corrente e desidratados à sombra.

3.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A alga seca foi moída em moinho de faca e submetida à extração aquosa (1,5% p/v) sob agitação mecânica, à temperatura ambiente por 16 hs. O extrato aquoso assim obtido foi centrifugado (6.000 rpm por 20 minutos) e à fração sobrenadante adicionou-se 2 volumes de etanol, sendo novamente centrifugada (12.000 rpm por 20 min). O resíduo de centrifugação foi ressolubilizado em água, dialisado contra água destilada, concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida e liofilizado, obtendo-se uma fração a qual denominou-se PC66, enquanto que ao sobrenadante alcoólico (etanol 66%) adicionou-se mais 1 volume de etanol, e seguiu-se a mesma metodologia

para a obtenção de uma nova fração, denominada PC75. O sobrenadante alcoólico resultante desta extração (etanol 75%) foi reservado.

3.3. ESTUDO DAS PORFIRANAS SULFATADAS

3.3.1 TRATAMENTO ALCALINO

Foram realizadas com a finalidade de se obter frações quimicamente modificadas. As frações polissacarídicas foram solubilizadas em água destilada (0,2 g%) e reduzidas com boroidreto de sódio (NaBH_4 - 10% em massa do polissacarídeo) por 16 h. Adicionou-se então hidróxido de sódio 3M, para a concentração final 1M, novamente adicionou-se NaBH_4 (5% em massa). As soluções foram então mantidas a temperatura de 80°C em banho termostatizado por 1 e 3 horas (NOSEDA & CERREZO, 1995), sendo em seguida neutralizadas com ácido clorídrico fumegante, dializadas e liofilizadas. As frações quimicamente modificadas assim obtidas foram denominadas de PC66m₁, PC66m₃, PC75m₁ e PC66m₃.

3.3.2. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA

A composição monossacarídica das frações foi determinada através de hidrólise ácida total do tipo hidrólise redutiva de acordo com o método de STEVENSON & FURNEAUX (1991). Esta hidrólise se processa em duas etapas, na primeira, ocorre a liberação e a concomitante redução das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose na presença do complexo borano-4-metil morfolina, um agente redutor estável em meio ácido (TFA 3M, 80°C por 15 minutos); na segunda ocorre a liberação e a redução das demais unidades constituintes do polímero (TFA 2M, 120°C, 90 minutos). Uma vez reduzidas todas as unidades, as mesmas foram acetiladas (anidrido acético/TFA concentrado, 15 minutos, 50° C) e lavadas com água, clorofórmio (CHCl_3) e solução de bicarbonato de sódio saturado (NaHCO_3). Os monossacarídeos na

forma de acetatos de alditóis foram extraídos na fase clorofórmica e então analisados por cromatografia líquido gasosa (CLG) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CLG-EM).

3.3.3. HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

As frações modificada por tratamento alcalino foram submetidas à hidrólise ácida parcial de acordo com USOV & ELASHVILI (1991). O polissacarídeo foi inicialmente dissolvido em água (1,3 g%) e a solução aquecida a 60°C para a completa solubilização, complexo borano-4-metil morfolina foi acrescentado (9 g%) seguido por TFA 2M e a mistura foi mantida à 65°C por 8 horas.

3.3.4. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

As porfiranas também foram submetidas a hidrólise ácida total (ácido fórmico 45%, 100°C, 15 h) seguida por redução com NaBH₄ ou NaBD₄ *overnight*, acetilação (anidrido acético, 120°C, 1,5h) e lavagem com água/CHCl₃/NaHCO₃, para posterior análise por CLG e CLG-EM.

3.3.5. METILAÇÃO

As frações inicialmente reduzidas com boridreto de sódio (NaBH₄) foram percolados em coluna de Dowex 50x8, previamente tratada com solução de trietilamina 5% (10ml) e em seguida eluída com água até pH 5,0. Deste modo recupera-se o polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio, sendo assim solúvel em dimetil sulfóxido (DMSO) - um solvente aprótico no qual os polissacarídeos sulfatados são geralmente insolúveis, dificultando assim o processo de metilação (STEVENSON & FURNEAUX, 1991). Seguiu-se então o processo de metilação de acordo com o método de CIUCANU & KEREK (1984) através da adição alternada de NaOH pulverizado e iodeto de metila (CH₃I) ou iodeto de metila deuterado (CD₃I). O material metilado foi então dialisado,

liofilizado e hidrolisado de acordo com o método de STEVENSON & FURNEAUX (1991) e analisados por CLG e CLG-EM na forma de alditóis acetatos.

3.3.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GRUPOS SULFATO

O teor de sulfato das amostras foi determinado de acordo com o método gelatina-BaCl₂ (DODGSON, 1961), após hidrólise das amostras (HCl 1M, 5h, 105°C).

3.3.7. POLARIMETRIA

A determinação da rotação ótica específica (α_D^{20}) das amostras foi realizada em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autopol III, a 25°C utilizando amostras na concentração de 0,2g% em água.

3.3.8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.3.8.1. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO EM SEPHAROSE 2-B

As frações nativas foram purificadas através de cromatografia de gel permeação em SEPHAROSE 2-B (Pharmacia - limite de exclusão para polissacarídeos: $10^5 - 20 \times 10^6$) utilizando-se solução de NaCl 1M como eluente. A eluição foi realizada, utilizando-se coletor automatizado 7000 ULTRORAC® (LKB BROMMA), em frações de 4 mL, até obter-se resultado negativo no teste do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Características da coluna: V_t = 560 mL; V_o = 200mL.

3.3.8.2. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO EM BIOGEL P-2

A mistura de oligossacarídeos obtida como produto da hidrólise parcial da porfirana foi separada por cromatografia de gel permeação em BIOGEL P-2

(BIORad - limite de exclusão para polissacarídeos: até 1.800) utilizando-se água destilada como eluente. A eluição foi realizada, utilizando-se coletor automatizado 7000 ULTRORAC® (LKB BROMMA), em frações de 4 mL, até obter-se resultado negativo no teste do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Características da coluna: $V_t = 200\text{mL}$; $V_o = 60\text{ mL}$.

3.3.8.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (CLG)

As análises por cromatografia líquido-gasosa foram realizadas em Cromatógrafo Hewlett Packard 5890, com detector de ionização de chama (300°C) e injetor (250°C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm de d. i.), revestida com DB-225 (0,25 μm) em diferentes temperaturas: as análises cromatográficas para acetatos de alditol foram realizadas na temperatura de 220°C e as amostras de acetatos de alditol parcialmente metilados a 210°C .

3.3.8.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE MASSA (CLG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo a gás "Varian", modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa da marca Finnigian Mat, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225 da marca J.W. As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C , por minuto, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de $40^\circ\text{C min}^{-1}$ até 230°C , mantendo-se constante a partir deste valor. Utilizou-se o gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL.min^{-1} . As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/e 90 a 220. Este método foi utilizado para a identificação dos acetatos de alditol e acetatos de alditol parcialmente metilados por meio dos

seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976), comparados com padrões.

3.3.8.5. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DIFERENCIAL E ESPALHAMENTO DE LUZ EM MULTIÂNGULOS (MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR

3.3.8.5.1. Determinação da variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc): soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0mg da amostra em 1 ml de $NaNO_3$ e azida de sódio de cada fração, foram previamente filtradas em membranas millipore 0,45 μm e armazenadas em viais rigorosamente limpos. As análises foram realizadas utilizando-se 500 μL de cada solução em HPLC acoplado a espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 mL/min e pressão de 67 psi a 20°C.

3.3.8.5.2. Análise de homogeneidade e de determinação da massa molecular ponderal média (M_w): para a análise de homogeneidade preparou-se uma solução de 2 mg da amostra em 1 mL de nitrito de sódio ($NaNO_3$ 0,1M) e azida de sódio (200ppm) dissolvidas em água milliQ, previamente filtradas em membranas millipore (acetato de celulose) de 0,45 e 0,22 μm . A análise foi realizada utilizando-se 500 μL de solução em HPLC acoplado a espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 mL/min. Para a determinação da massa molecular ponderal média utilizou-se o valor de dn/dc anteriormente obtido juntamente a análise de homogeneidade

As análises por GPC foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS,

com limites de exclusão de $1 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$, em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_3 $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ contendo NaN_3 200 ppm, pressão de 920 psi a 20°C .

3.3.9. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) mono e bidimensionais foram realizadas em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em probe de diâmetro externo de 5 mm ou 10 mm, com as amostras dissolvidas em água deuterada (D_2O), a temperatura de 30°C para oligossacarídeos e 70°C para polissacarídeos. Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises de ^{13}C ($\delta=30,2$ ppm) como para ^1H ($\delta=2,224$ ppm).

3.3.9.1. TÉCNICAS DE RMN MONODIMENSIONAIS

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

Os espectros de RMN – ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas, em média, 100 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

3.3.9.1.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 DEPT (DISTORTIONLESS ENHANCEMENT BY POLARIZATION)

Existem diferentes tipos de experimentos de DEPT, os quais diferem quanto ao ângulo de transferência de polarização ($\theta_z = 45, 90$ ou 135) para observação de ^{13}C acoplado a prótons (^1H). Variando-se este ângulo é possível visualizar os carbonos CH, CH_2 e/ou CH_3 como sinais negativos em relação a

linha de base, é importante mencionar que nos três tipos de DEPT os sinais dos carbonos quaternários (não ligados diretamente ao H) não aparecem.

Assim os espectros de RMN – ^{13}C DEPT foram aqui obtidos em um θ_z de 135° , onde CH e CH_3 ocorrem em fase positiva em relação a linha de base e CH_2 em fase negativa, numa frequência de 100,61MHz em janela espectral de 220 ppm e resolução de 32K.

3.3.9.1.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN – ^1H)

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

3.3.9.2. TÉCNICAS DE RMN BIDIMENSIONAIS

3.3.9.2.1. COSY (CORRELATION SPECTROSCOPY)

Esta é uma técnica homonuclear utilizada para correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H que estão acoplados um com o outro. Assim nos carboidratos o H-1 de um monossacarídeo apresenta acoplamento com o H-2 da mesma unidade, sendo possível observar esta interação na forma de um pico cruzado (cross peak) entre os mesmos sinais, quantificar esta interação através da determinação da constante de acoplamento (J) e ainda determinar o deslocamento químico do H-2 a partir do H-1. Desta forma a partir do sinal de H-2 pode ser determinado o H-3 e assim sucessivamente ao longo do anel. Como cada unidade monossacarídica apresenta um padrão de constantes de acoplamento característico, com estes resultados é possível determinar o tipo de açúcar presente na estrutura.

3.3.9.2.2. TOCSY (TOTAL CORRELATION SPECTROSCOPY)

Nesta técnica, também homonuclear, os picos cruzados (cross peaks) são gerados não só pelos prótons vicinais e sim por todos os núcleos do sistema de spin acoplado, desta forma temos os picos cruzados correspondentes a interação do H-1 com H-2, assim como, do H-1 - H-3, H-1 - H-4 e assim sucessivamente.

3.3.9.2.3 HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY)

Esta técnica heteronuclear, permite determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados a quais átomos de carbono (^{13}C) a partir de sinais de ^{13}C conhecidos ou de ^1H já determinados por COSY e TOCSY.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio de extração aquosa seguida por 2 precipitações sucessivas com etanol absoluto obtiveram-se, a partir da alga *Porphyra columbina* Montagne, fase gametofítica (142,7g de peso seco – FIGURA 9), duas frações polissacarídicas, as quais foram denominadas PC66 (2,24g; 1,6% de rendimento), precipitada com 2 volumes de etanol e PC75 (4,71g; 3,3% de rendimento), precipitada com 3 volumes de etanol (FIGURA 10). O rendimento total apresentado nesta extração foi de apenas 4,9%, muito baixo quando comparado ao obtido por outros autores que também estudaram esta espécie, os quais chegaram a valores de 15,6 a 21,2% (VILLARROEL & ZANLUNGO, 1981 e BRASCH *et al.*, 1981), porém tais autores realizaram exaustivas extrações com água quente (100°C), que não foram realizadas aqui.

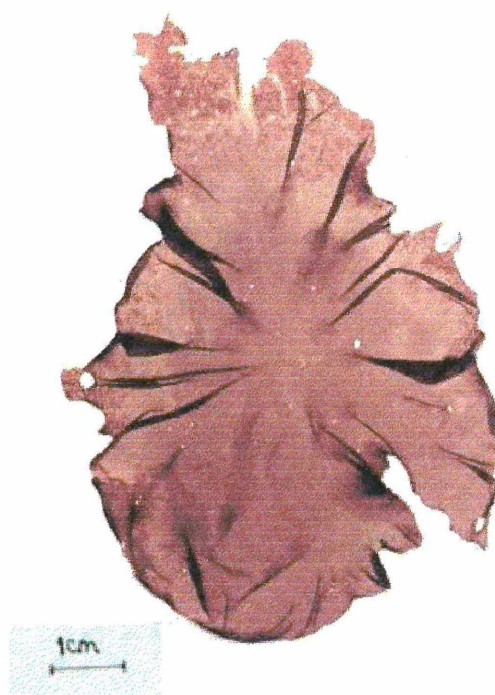


FIGURA 9: Alga *Porphyra columbina* Montagne, fase gametofítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

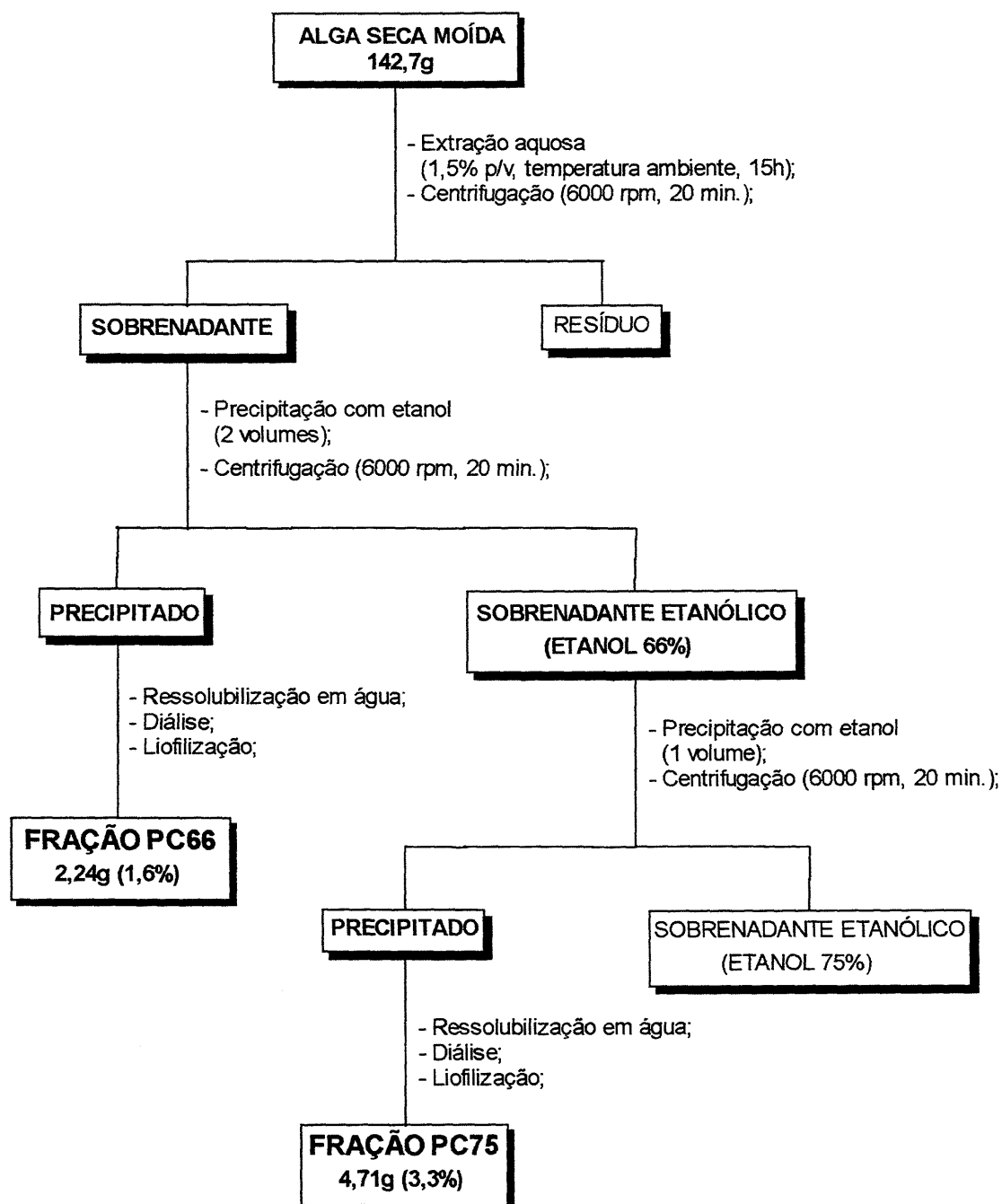
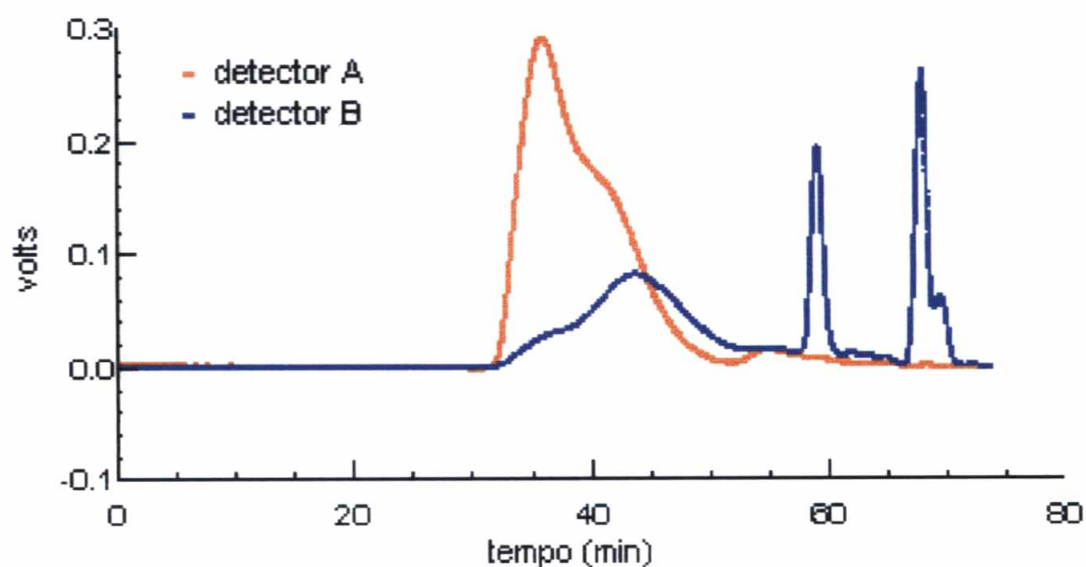


FIGURA 10: Fluxograma da extração dos polissacarídeos da *Porphyra columbina* Montagne.

A fração PC75, previamente estudada, se mostrou constituída por galactanas sulfatadas lineares do tipo agarana, com uma estrutura típica de porfirana, a qual já se encontra completamente esclarecida (NOSEDA *et al.*, 2000 - b), desta maneira a fração PC66 constitui o objeto de estudo deste trabalho.

Análises de homogeneidade, obtidas através de cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS), mostraram que a fração PC66 não se mostrava totalmente homogênea, devido a presença de possíveis agregados e fragmentos moleculares (FIGURA 11), com seu polissacarídeo majoritário apresentando uma massa molecular de $2,76 \times 10^5$ ($dn/dc=0,1216$).



Detector A – espalhamento de luz
Detector B – índice de refração

FIGURA 11: Perfil cromatográfico apresentado pela fração PC66 mediante análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS, a qual apresentou moléculas contaminantes com elevada e reduzida massa molecular.

Na tentativa de aumentar a pureza desta fração, a mesma foi ressolubilizada e dialisada contra água destilada, sendo em seguida centrifugada (10.000 rpm por 15 minutos), os polissacarídeos solúveis, que permaneceram no sobrenadante após esse processo, deram origem a fração denominada PC66sol (FIGURA 12). Esta fração ainda apresentou seu perfil por HPSEC-MALLS similar ao da fração PC66 (FIGURA 13) e uma massa molecular de $2,509 \times 10^5$.

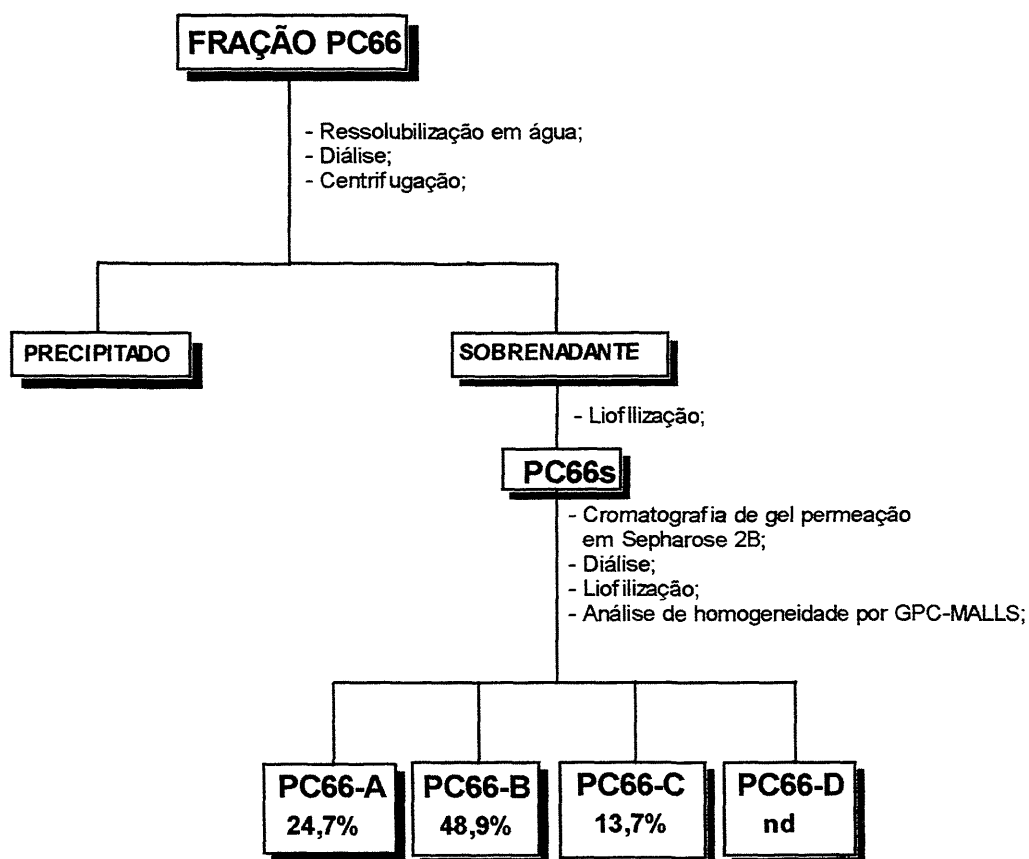
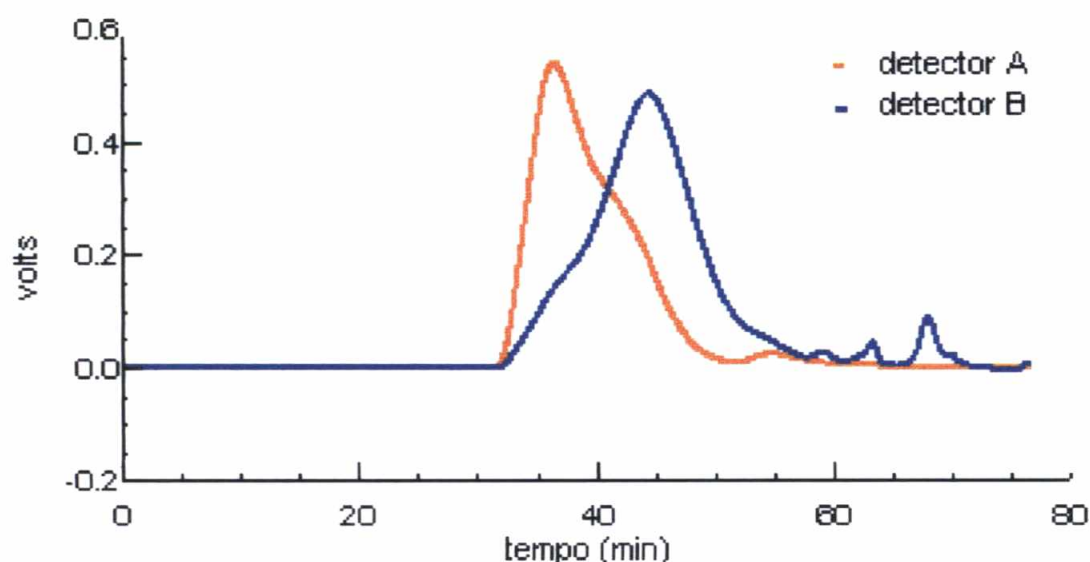


FIGURA 12: Fluxograma da purificação dos polissacarídeos da fração PC66 de *Porphyra columbina* Montagne.



Detector A – espalhamento de luz
 Detector B – índice de refração

FIGURA 13: Perfil cromatográfico apresentado pela fração PC66sol mediante análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS, mostrando apenas baixa contaminação por possíveis agregados moleculares.

Para obter-se uma fração com um grau de homogeneidade maior, a fração PC66sol foi submetida a cromatografia de exclusão em Sepharose-2B (eluída com NaCl 1M), sendo assim possível, através do perfil de eluição, separar quatro sub-frações polissacarídicas, as quais após diálise contra água destilada e liofilização, foram denominadas: PC66A, PC66B, PC66C e PC66D (rendimento total: 87,3% - FIGURAS 12 e 14).

A sub-fração PC66B (que passará a partir de agora a ser chamada simplesmente de PC66) que se mostrou a mais homogênea das sub-frações quando analisada por HPSEC-MALLS (FIGURA 15), foi utilizada para a caracterização do seu polissacarídeo majoritário (massa molecular de $1,093 \times 10^5$).

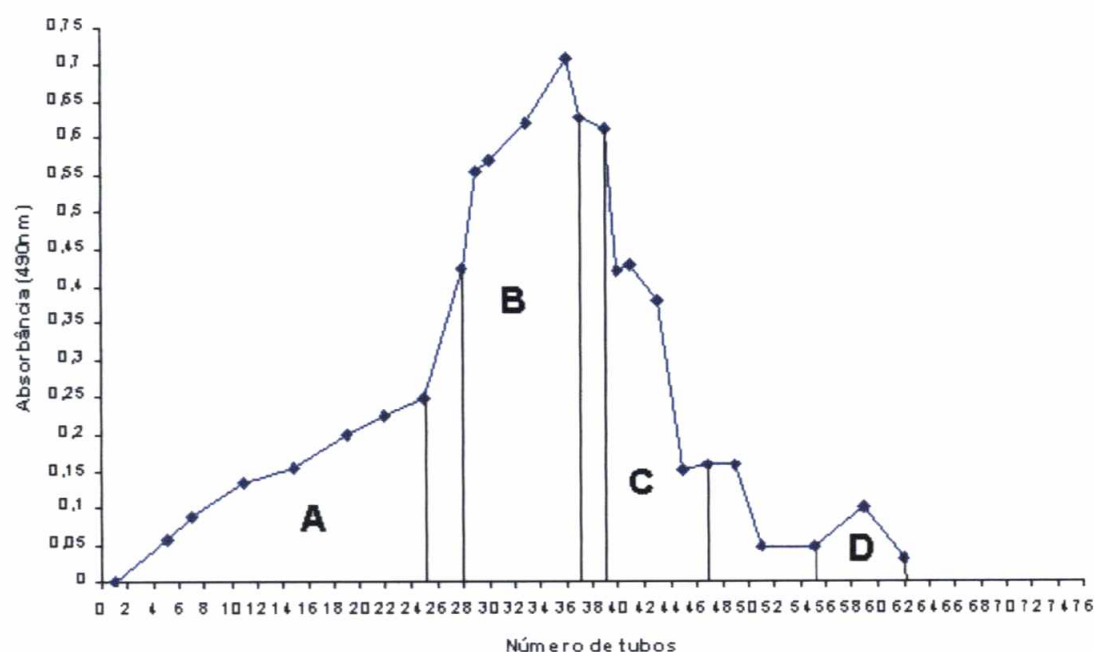
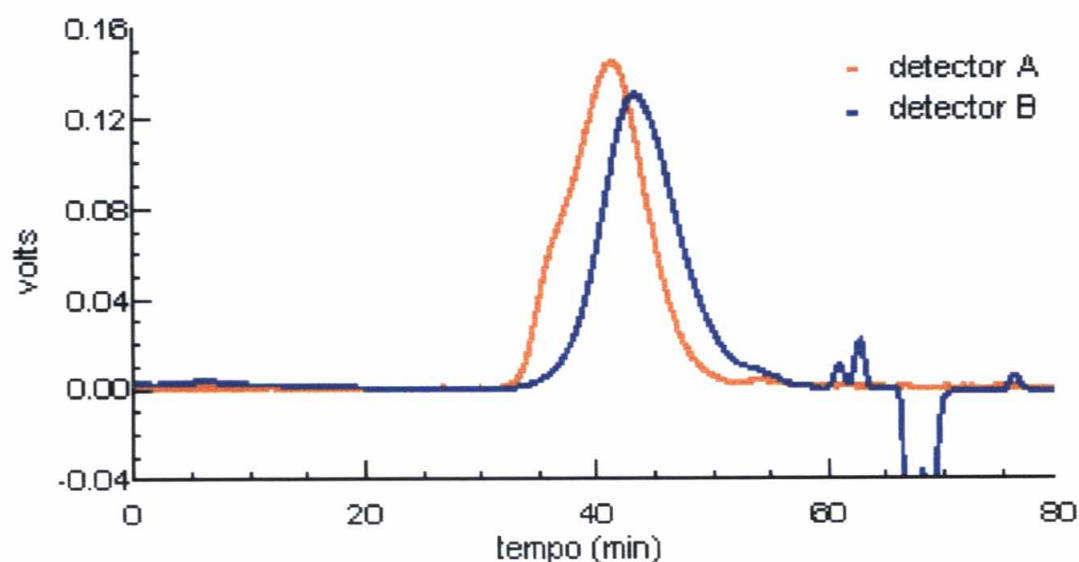


FIGURA 14: Perfil de eluição da fração PC66sol em Sepharose 2-B (eluição NaCl 1M) indicando a delimitação das sub-frações purificadas PC66A, PC66B, PC66C e PC66D.



Detector A – espalhamento de luz
Detector B – índice de refração

FIGURA 15: Perfil cromatográfico apresentado pela fração PC66B mediante análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS, mostrando baixa contaminação por possíveis agregados moleculares.

Para a determinação da composição monossacarídica, a fração PC66 foi inicialmente submetida à hidrólise ácida total do tipo hidrólise redutiva (STEVENSON & FURNEAUX, 1991), a qual preserva as unidades de 3,6-anidrogactose naturalmente encontradas em polissacarídeos de algas vermelhas, seguida de acetilação. A análise do hidrolisado por cromatografia líquido gasosa (CLG), revelou que tais polissacarídeos se tratavam de galactanas, devido ao alto teor de unidades de galactose (59,1 mol%). Juntamente com este açúcar foi detectada a presença de 6-O-metil galactose (24,1 mol%) e 3,6-anidrogactose (10,4 mol % - TABELA 1), juntos, estes três monossacarídeos representam 93,6% do total dos monossacarídeos presentes na fração PC66.

TABELA 2: Composição monossacarídica das frações nativa (PC66) e modificadas por tratamento alcalino^a (NaOH 1M, 80°C) durante 1 (PC66m₁) e 3 horas (PC66m₃), determinada por CLG, após hidrólise redutiva^b, na forma de alditóis acetatos, em mol%.

Fração	Monossacarídeos (mol%)						
	3,6-Angal ¹	Xil ²	6-O-Megal ³	3-/4-Megal ⁴	Man ⁵	Gal ⁶	Glc ⁷
PC66	10,4	2,6	24,1	0,8	1,9	59,1	1,1
PC66m ₁	46,7	1,5	19,8	0,7	1,6	28,8	0,9
PC66m ₃	52,0	-	20,4	-	-	27,6	-

¹3,6-anidrogactose; ²xilose; ³6-O-metil galactose; ⁴3 ou 4-O-metil galactose; ⁵manose; ⁶galactose; ⁷glucose;

^a realizado nas condições descritas por NOSEDA & CERREZO, 1995;

^b segundo o método descrito por STEVENSON & FURNEAUX, 1991.

Unidades naturalmente metiladas são comumente encontradas em polissacarídeos de algas vermelhas, normalmente substituindo os carbonos 6 das unidades de β -D-galactose (6-O-metil β -D-galactose) e 2 das de α -L-galactose (2-O-metil α -L-galactose 6-sulfato ou 2-O-metil 3,6-anidro- α -L-galactose), respectivamente, porém em baixas percentagens (FALSHAW *et al.*, 1998).

Contudo, agaranas obtidas a partir de espécies dos gêneros *Gracilaria* e *Curdea*, podem apresentar até 50% de suas unidades constituintes como 6-O-metil β -D-galactose, ainda, completa metilação das unidades de β -D-galactose (em carbono 6) e em carbono 2 das unidades de 3,6-anidro α -L-galactose tem sido descritas neste último gênero (FALSHAW *et al.*, 1998).

3,6-Anidrogallactose são unidades monossacarídicas unicamente encontradas em polissacarídeos de algas vermelhas e que os distinguem dos demais polissacarídeos sintetizados por outros grupos vegetais (USOV, 1984), podendo ser encontradas em percentagens variáveis até um máximo de 50%, como na agarose (PAINTER, 1983; ASPINALL, 1970).

É sabido que tanto unidades metiladas, como a 6-O-metil galactose, como a 3,6-anidrogallactose apresentam influência na capacidade geleificante das galactanas sulfatadas por aumentarem a força do gel (GUISELEY, 1970; FALSHAW *et al.*, 1998).

Quantidades pouco expressivas de outras unidades monossacarídicas também foram identificadas nas três frações: 3/4-O-metil galactose; xilose e manose, os quais provavelmente provêm dos polissacarídeos constituintes do componente fibrilar da parede celular (MUKAI *et al.*, 1981; GRETZ *et al.*, 1982; GRETZ & McCANDLESS, 1983; BALDAN *et al.*, 1995) e glucose, de ocorrência freqüente em frações de galactanas de algas vermelhas, tem sua origem atribuída

ao composto de reserva característico deste grupo, o amido das florídeas (USOV, 1992; FALSHAW *et al.*, 1998 – TABELA 1).

Grupos sulfato também são encontrados naturalmente em galactanas de algas vermelhas em diferentes posições (PAINTER, 1982), tanto em β -D-galactose como em α -galactose, porém no gênero *Porphyra*, tais grupos foram unicamente relatados esterificando os carbonos primários (C-6) de algumas unidades de α -D-galactose (BRASCH, *et al.*, 1981; VILLARROEL & ZANLUNGO, 1981; NOSEDA *et al.*, 2000 - b).

Uma vez confirmada a presença de unidades de 3,6-anidrogalactose, a ocorrência de presença de seu açúcar precursor, a galactose 6-sulfato, é quase certa. Unidades de galactose naturalmente sulfatadas, não podem ser detectadas diretamente por CLG devido a perda destes grupos durante a hidrólise do polissacarídeo, sendo assim incluídas na percentagem total de galactose.

A presença destes grupos nos polissacarídeos da fração PC66 foi verificada inicialmente através da determinação do teor total de grupos sulfato (DODGSON & PRICE, 1962) da fração nativa e modificada por tratamento alcalino (NaOH 1M, 80°C, 1 - NOSEDA & CEREZO, 1995). A fração PC66 apresentou 16,5% de grupos sulfato (expresso como SO₃Na) enquanto a fração obtida após 1 hora de tratamento alcalino (PC66m₁) 11,5%.

Estes valores mostram que o tratamento alcalino promove um decréscimo no teor de sulfato devido a ciclização das unidades de galactose 6-sulfato para originar unidades de 3,6-anidrogalactose (FIGURA 16).

Após hidrólise redutiva e acetilação, as frações quimicamente modificadas por tratamento alcalino, apresentaram uma redução significativa no teor de galactose e um expressivo aumento no de 3,6-anidrogalactose, quando analisadas por CLG, confirmando a ocorrência de galactose 6-sulfato no polissacarídeo

nativo, cuja percentagem foi determinada, através da diferença no teor de unidades de 3,6-anidrogactose presentes na molécula antes (PC66) e após 3 horas de tratamento (PC66m₃), como sendo 31,5 mol% (TABELA 1). A fração PC66m₃ apresentou unicamente unidades de galactose, 6-O-metil galactose e 3,6-anidrogactose, como determinado por análises de CLG e CLG-EM.

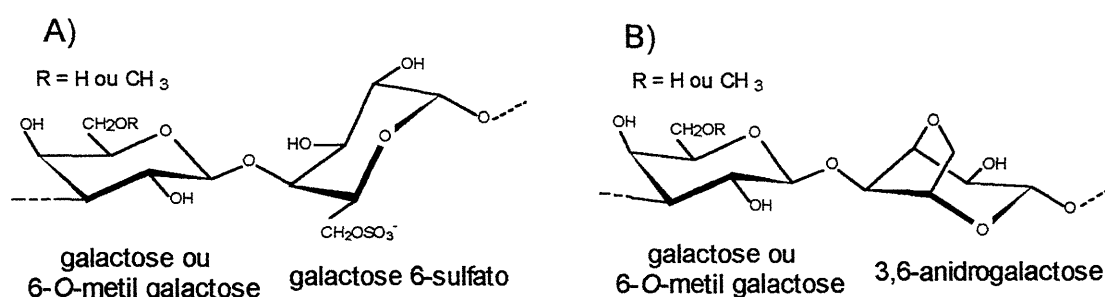


FIGURA 16: Alteração química e estrutural decorrente do tratamento alcalino: conversão das unidades precursoras de α -L-galactose 6-sulfato (A) para 3,6-anidro- α -L-galactose (B).

Através de análises de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de ¹³C) da fração PC66, foi possível determinar que os grupos sulfato nestes polissacarídeos, se encontram unicamente esterificando o carbono 6 das unidades de α -L-galactose, devido a identificação dos sinais em 100,91 e 67,28 ppm, correspondendo aos carbonos anomérico (carbono 1) e primário (carbono 6) das unidades de α -L-galactose 6-sulfato. Não foi encontrado nenhum outro sinal que pudesse ser atribuído a outros carbonos esterificados por grupos sulfato (FIGURA 17).

Os resultados de composição monossacarídica e RMN de ^{13}C correlacionados aos valores negativos de rotação óptica específica obtidos para as frações PC66 ($\alpha_D^{20} = -46,4$) e PC66m₁ ($\alpha_D^{20} = -51,15$), indicam a presença de unidades de L-galactose como seu anômero α , caracterizando a fração polissacarídica PC66 isolada da alga *P. columbina* como constituída por galactanas sulfatadas do tipo agarana.

Ainda, as análises de RMN de ^{13}C não indicaram a presença de grupos acetal de ácido pirúvico, outro substituinte comum em galactanas do tipo agarana (PAINTER, 1982), uma vez que os sinais característicos deste grupo em 25,0, 175,3 e 101,3 ppm, referentes ao grupo metil, carbonílico e ao carbono acetálico respectivamente, não foram observados. Da mesma forma não foi detectado o sinal correspondente ao carbono 6 substituído por este grupo, em 64,9 ppm (FIGURA 17 – NOSEDA *et al.*, 2000 - a). Estes resultados estão de acordo com os publicados por BRASCH *et al.* (1981) e por VILLARROEL & ZANLUNGO (1981), os quais também não detectaram a presença de polissacarídeos piruvatados em *P. columbina*.

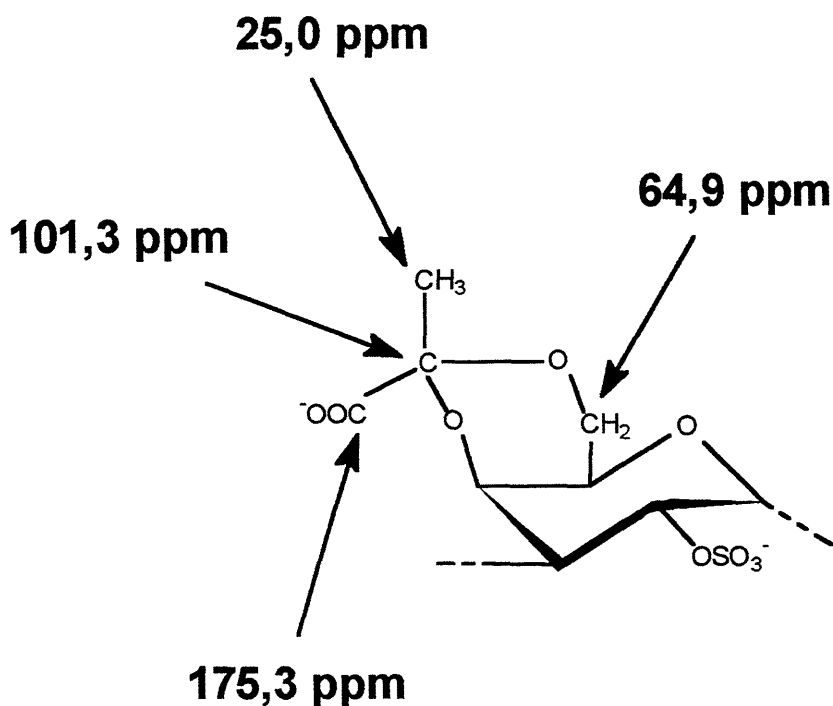
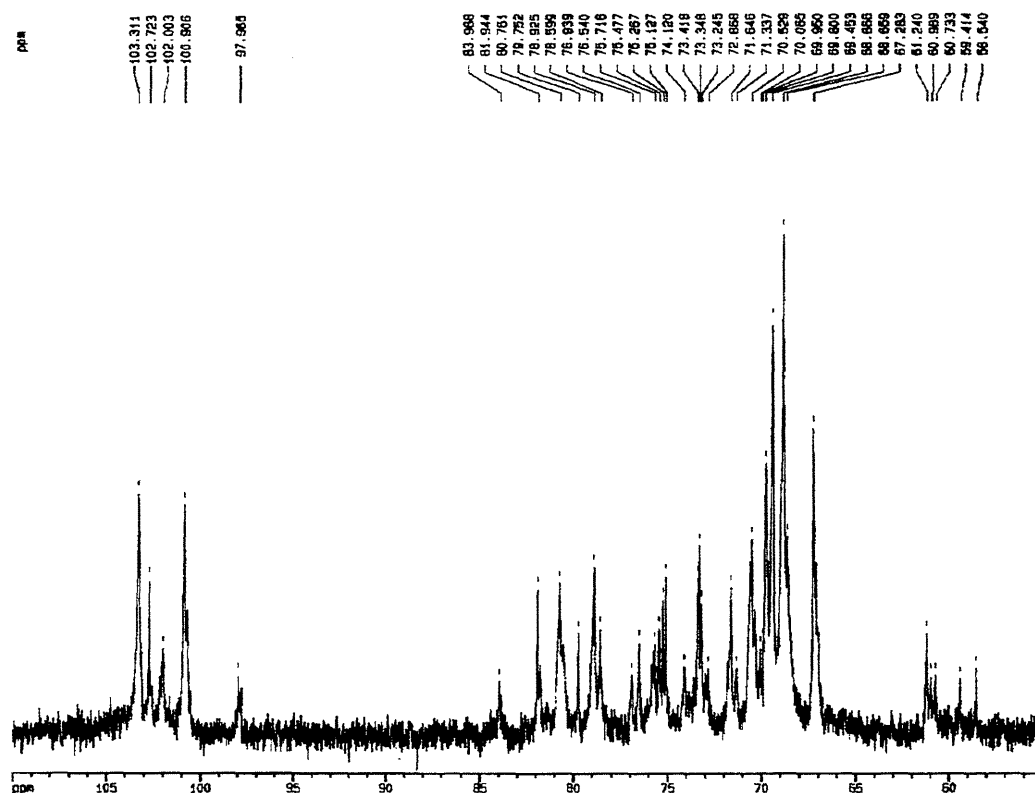


FIGURA 17: Estrutura apresentada pelo grupo acetal de ácido pirúvico [4,6-O-(1-carboxietilideno)] esterificando uma unidade β -D-galactose, indicando os deslocamentos químicos característicos de seus carbonos metílico (25,0 ppm), carbonílico (175,3 ppm) e acetálico (101,3 ppm) bem como do carbono 6 substituído (64,9 ppm), por RMN de ^{13}C .

Na região anomérica do espectro de RMN de ^{13}C (110 - 90 ppm) da fração PC66 foi possível identificar também outros sinais, os quais foram atribuídos aos C-1 das seguintes unidades monossacarídicas: em 103,31 ppm para β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose quando ligada glicosidicamente a α -L-galactose 6-sulfato e 102,00 ppm quando ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -D-galactose e em 97,96 ppm para 3,6-anidro- α -L-galactose, todos na forma piranosídica (FIGURA 18).



103,31 ppm: C-1 de β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose ligada glicosidicamente a α -L-galactose 6-sulfato;
102,72 ppm: ?
102,00 ppm: C-1 de β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose ligada glicosidicamente a 3,6-anidro- α -D-galactose;
100,90 ppm: C-1 de α -L-galactose 6-sulfato ligada glicosidicamente a β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose;
97,97 ppm: C-1 de 3,6-anidro- α -L-galactose ligada glicosidicamente a β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose.

FIGURA 18: Espectro de RMN de ^{13}C da fração PC66 (em D_2O a 70°C), indicando o assinalamento correspondente aos carbono anoméricos de cada unidade constituinte deste polissacarídeo.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

A análise da região anomérica da fração modificada por três horas de tratamento alcalino, PC66m₃, indicou tratar-se de uma fração totalmente ciclizada, devido a inexistência dos sinais em 103,31 ppm (C-1 das unidades de β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose ligadas glicosidicamente a α -L-galactose 6-sulfato), 100,91 ppm (C-1 das unidades de α -L-galactose 6-sulfato ligadas glicosidicamente a β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose) e 67,28 ppm (C-6 sulfatado das unidades de α -L-galactose) e ocorrência única dos sinais em 102,10 ppm (C-1 das unidades de β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose ligada glicosidicamente a 3,6-anidro- α -D-galactose) e 97,83 ppm (C-1 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose ligada glicosidicamente a β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose) na região anomérica, os quais correspondem aos sinais em 102,00 e 97,97 ppm na fração PC66 com intensidades aumentadas (FIGURA 19).

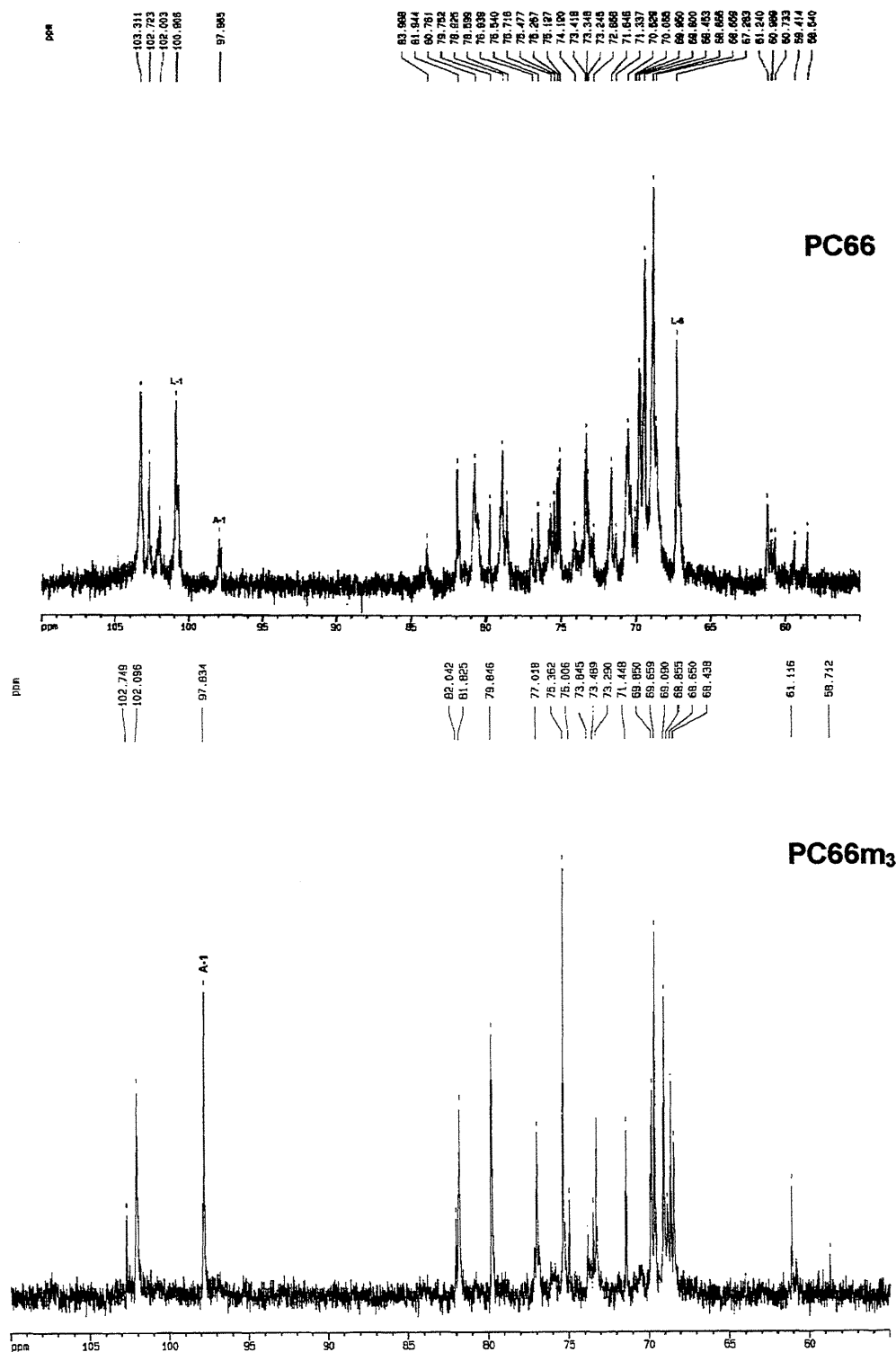
O espectro de RMN de ^{13}C ainda permitiu a identificação de outros sinais os quais foram atribuídos aos demais carbonos das diferentes unidades monossacarídicas constituintes do polímero da fração PC66m₃, através da comparação deste com o da fração PC75m₃ (NOSEDA *et al.*, 2000 - b; TABELA 3). Entretanto este espectro mostrou, além dos sinais presentes na fração PC75, alguns sinais exclusivos à PC66 (FIGURA 20).

Os sinais encontrados em 102,75 ppm, na região dos carbonos anoméricos, 82,04 ppm, que aparece na mesma região de ocorrência dos sinais correspondentes a carbonos substituídos, 73,85, 73,49 e 68,86 ppm, os quais também foram observados na análise do espectro em DEPT.

A análise em DEPT ainda permitiu a identificação do sinal em 59,53 ppm, de ocorrência na mesma região dos carbonos metílicos, estes sinais se tornaram o

principal diferencial destas porfiranas com relação a outras anteriormente descritas, biossintetizadas pela mesma ou por diferentes espécies de algas do gênero *Porphyra* e *Bangia* (REES & CONWAY 1962; BRASCH, *et al.*, 1981; VILLARROEL & ZANLUNGO, 1981; MORRICE *et al.*, 1983, NOSEDA *et al.*, 2000 - b).

Pela análise do espectro de RMN em DEPT da fração PC66m₃, foi possível verificar que o sinal em 68,85 ppm apresentava-se invertido, sugerindo desta maneira que algumas unidades de β -D-galactopiranosose apresentavam-se substituídas em C-6, uma vez que este sinal era distinguível dos sinais referentes aos C-6 das unidades de β -D-galactopiranosose livre (61,03 ppm) ou substituído por grupos metil (71,39 ppm) e das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (69,02 ppm), esta substituição ocasiona o deslocamento do sinal correspondente a este carbono para um campo mais baixo. Outro sinal em 59,53 ppm, o qual aparece na mesma região de ocorrência dos sinais correspondentes ao carbono dos grupos metil – CH₃, foi observado nesta análise. Estes sinais e suas regiões de ocorrência sugerem que o grupo substituinte em unidades de β -D-galactose seja glicosil (provavelmente uma unidade de 6-O-metil β -D-galactose – FIGURA 21) .



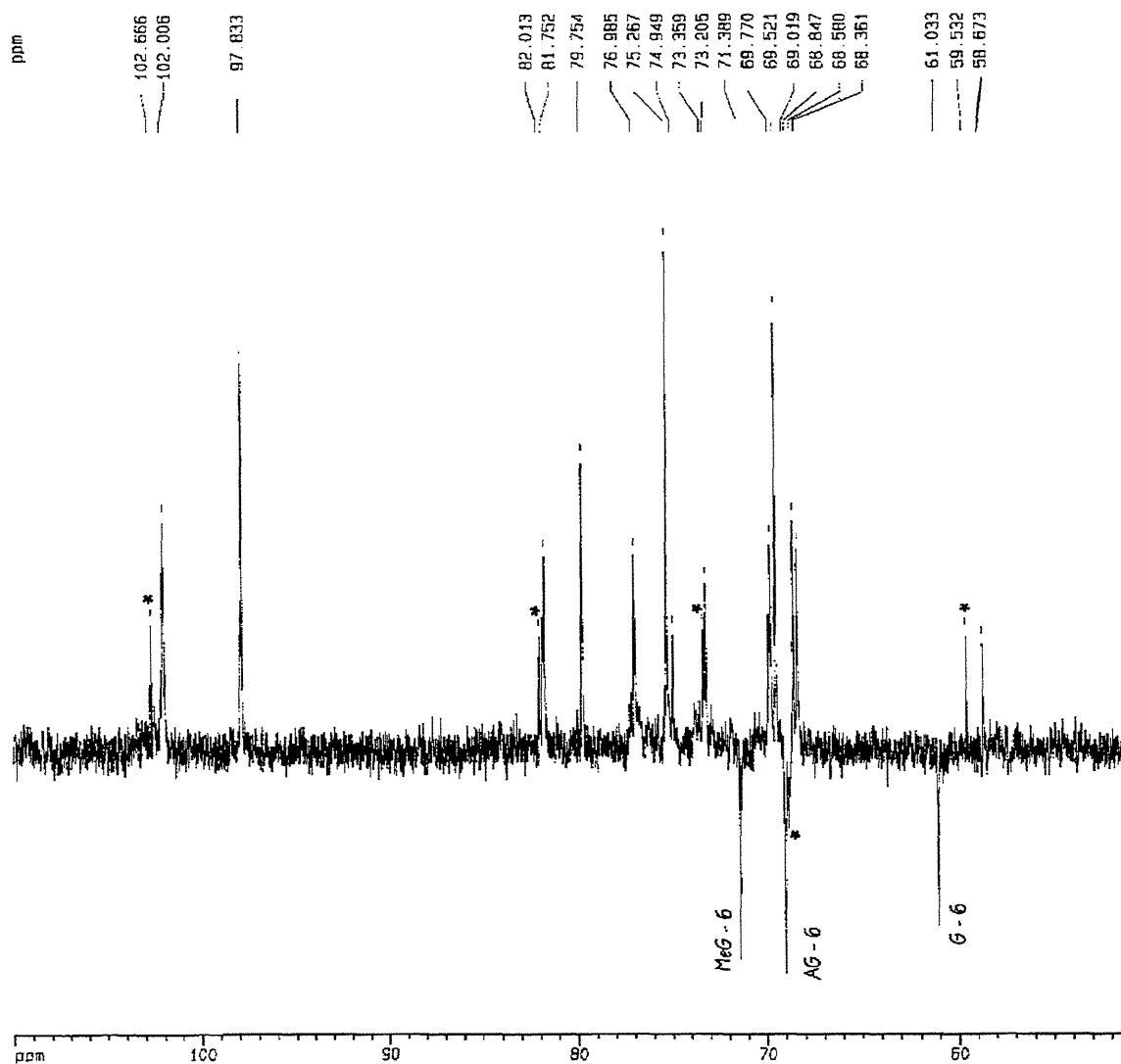
L - α -L-galactopiranosose 6-sulfato; *A* - 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose.

FIGURA 19: Comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C das frações PC66 e PC66m₃ evidenciando o aumento no teor de 3,6-anidro- α -L-galactose após tratamento alcalino.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

FIGURA 20: Comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C das frações PC66m₃ e PC75m₃ (NOSEDA *et al.*, 2000 - b) mostrando além de uma alta similaridade um conjunto de sinais exclusivamente encontrados na PC66m₃.

*experimento realizado como descrito no ítem 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).



G - β -D-galactopiranoose; M - 6-O-metil β -D-galactopiranoose; A - 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose.

*sinais não encontrados na fração PC75m₃.

FIGURA 21: Espectro de RMN de ^{13}C em DEPT ($\theta_z = 135$) da fração PC66m₃ mostrando a inversão do sinal em 68,8 ppm.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

TABELA 3: Deslocamentos químicos dos carbonos da fração PC66m₃, observados nos espectro de RMN de ¹³C comparados aos da fração PC75m₃ (NOSEDA *et al.*, 2000 - b).

Unidade e carbono correspondente	Deslocamento químico (ppm)	
	PC75m ₃	PC66m ₃
→3) β-D-galactose (1→		
C-1	102,02	102,09
C-2	68,38	68,44
C-3	81,85	81,82
C-4	69,88	69,85
C-5	74,96	75,00
C-6	61,05	61,11
→3) 6-O-metil β-D-galactose (1→		
C-1	102,02	102,09
C-2	68,60	68,65
C-3	81,77	81,82
C-4	69,79	69,85
C-5	73,22	73,29
C-6	71,40	71,45
O-CH ₃	58,69	58,72
→4) 3,6-anidro- α-L-galactose (1→		
C-1	97,83	97,83
C-2	69,55	69,66
C-3	76,99	77,02
C-4	79,78	79,84
C-5	75,29	75,36
C-6	69,04	69,09
Sinais excedentes		
Região dos carbonos anoméricos		102,75
Região dos carbonos substituídos		82,04
Região dos carbonos livres		73,85
		73,49
		68,85
Região dos carbonos metílicos *		59,53

* sinal observado no espectro de RMN DEPT.

A análise conjunta da composição monossacarídica e metilação fornece informações estruturais importantes, para tanto as frações PC66 e PC66m₃ foram submetidas ao processo de metilação, de acordo com CIUCANU & KEREK (1984) no intuito de determinar-se o tipo de ligação glicosídica e confirmar-se a ocorrência e a posição de grupos substituintes. Como as galactanas de algas vermelhas podem apresentar unidades naturalmente metiladas, utilizou-se durante o processo de metilação iodeto de metila deuterado (CD₃I), desta maneira possibilitando diferenciá-los quando submetidos à análise por espectrometria de massa (CLG-EM).

A metilação exaustiva das frações PC66 e PC66m₃ (entende-se por exaustiva 6 séries de metilação) originou uma grande variedade de unidades monossacarídicas parcialmente metiladas, as quais foram identificadas através de seus tempos de retenção por CLG e perfis de fragmentação característicos por CLG-MS (TABELA 4).

Para a fração PC66, dentre os derivados formados, os mais abundantes foram 2,4,6-tri-O-metil-galactose (40,6 mol%) e 2,3-di-O-metil-galactose (36,0 mol%), mas também foram identificadas as unidades: 2-O-metil-3,6-anidrogallactose (13,3 mol%), 2,6-di-O-metil-galactose (1,4 mol%), 2,4-di-O-metil-galactose (6,0 mol%) e 2,3,6-tri-O-metil-galactose (2,0 mol%). Todas as unidades tiveram suas percentagens relativas determinadas após hidrólise total e análise por CLG-MS.

O processo de metilação da fração quimicamente modificada PC66m₃, deu origem à praticamente os mesmos derivados metilados que para a fração PC66, porém com alterações das percentagens relativas a cada um (TABELA 4).

Dentre os derivados obtidos nesta fração, 2,4,6-tri-O-metil-galactose (35,0 mol%) e 2-O-metil-3,6-anidrogallactose (48,8 mol%) foram os mais abundantes. Ainda identificou-se 2,6-di-O-metil-galactose (0,7 mol%), 2,3,6-tri-O-metil-galactose (3,1 mol%), 2,4-di-O-metil-galactose (10,8 mol%) e 3,6-anidrogallactose (1,5 mol%), tais unidades tiveram suas percentagens relativas determinadas após hidrólise redutiva e análise por CLG.

Como resultado do processo de metilação, em ambas as frações foi identificado o derivado 2,4,6-tri-O-metil-galactose, este derivado originou-se a partir de unidades de galactose e 6-O-metil-galactose ambas substituídas glicosidicamente em C-3 (correspondendo a unidade A do dissacarídeo repetitivo ideal – FIGURA 5 página 18).

O derivado 2,3-di-O-metil-galactose, abundante na fração PC66 provém das unidades de galactose 6-sulfato substituídas glicosidicamente em C-4 (correspondendo a unidade B do dissacarídeo repetitivo ideal). A diferença entre a percentagem de galactose na amostra nativa (PC66 - 63,3%) e após três horas de tratamento alcalino (PC66m₃ - 27,6%) corresponde a um valor muito próximo a percentagem do derivado 2,3-di-O-metil galactose (35,7 e 36,0 mol% respectivamente), confirmando que a unidade que originou este derivado realmente foi a galactose 6-sulfato. Este derivado não foi identificado na fração PC66m₃, onde o derivado 2-O-metil-3,6-anidrogallactose encontra-se em alta percentagem, isto pode ser explicado pelo fato de que nesta última fração as unidades de galactose 6-sulfato se encontram ciclizadas a 3,6-anidrogallactose como resultado do tratamento alcalino, originando assim o derivado 2-O-metil-3,6-anidrogallactose (as percentagens destas duas últimas unidades, após

tratamento alcalino, se mostraram muito próximas: 52,0 e 48,8 mol%, respectivamente).

Estes resultados de metilação confirmam os obtidos por RMN de ^{13}C , os quais indicam uma estrutura do tipo agarana (porfirana) para estes polissacarídeos.

A partir da composição monossacarídica, dos resultados de metilação e das análises de RMN foi possível determinar a composição monossacarídica das porfiranas desta fração (6-O-me- β -D-galactose 23,4 mol%; β -D-galactose 24,5 mol%; α -L-galactose-6-sulfato 35,7 mol%; 3,6-anidro- α -L-galactose 13,3% - FIGURA 22).

A composição monossacarídica desta fração se assemelha a da fração PC75 anteriormente descrita (NOSEDA *et al.*, 2000 - b), porém distingue-se pela presença de algumas unidades de β -D-galactose substituídas em C-6 por um grupo de natureza provavelmente glicosil (6,0 mol%), confirmado por análises de RMN em DEPT (sinal invertido em 68,8 ppm), o qual impede a ligação do radical metil nesse carbono e de unidades de α -L-galactose não sulfatadas.

A utilização de hidrólise ácida total para quantificar os monossacarídeos parcialmente metilados da fração PC66 se fez necessária devido a presença, no polissacarídeo nativo, de unidades de galactose 6-sulfato, as quais originam por metilação 2,3-di-O-metil-galactose. Este tipo de unidade parcialmente metilada não é eficientemente clivada durante a hidrólise reductiva, prejudicando desta maneira a sua quantificação (STEVENSON & FURNEAUX, 1991).

TABELA 4: Composição monossacarídica apresentada pelas frações nativa (PC66) e quimicamente modificada por tratamento alcalino (PC66m₃) antes e após 6 séries de metilação^a, na forma de alditois acetilados, em mol%.

monossacarídeos	2M3,6AnG ¹	3,6AnG ²	2,4,6G ³	2,3,6G ⁴	2,6G ⁵	2,4G ⁶	2,3G ⁷	6G ⁸	2G ⁹	Gal ¹⁰
tipo de ligação	α -(1→4)	α -(1→4)	β -(1→3)	α -(1→4)		β -(1→3) e β -(1→6)	α -(1→4)	β -(1→3)		β -(1→3) ou α -(1→4)
Frações										
PC66 ^b	-	13,3	-	-	-	-	-	23,4	-	63,3
metilada ^c	13,3	-	40,6	2,0	1,4	6,0	36,0	-	0,2	0,5
PC66m ₃ ^b	-	52,0	-	-	-	-	-	20,4	-	27,6
metilada ^b	48,8	1,5	35,0	3,1	0,7	10,8	-	-	-	0,2

¹2-O-metil-3,6-anidrogactose; ²3,6-anidrogactose; ³2,4,6-tri-O-metil-gactose; ⁴2,3,6-tri-O-metil-gactose; ⁵2,6-di-O-metil-gactose; ⁶2,4-di-O-metil-gactose; ⁷2,3-di-O-metil-gactose; ⁸6-O-metil-galaotose; ⁹2-O-metil-gactose; ¹⁰galaotose.

^a segundo CIUCANU & KEREK (1984), seguindo modificação introduzida por STEVENSON & FURNEAUX (1991), utilizando iodeto de metila deuterado (CD₃I);

^b determinada após hidrólise reductiva (STEVENSON & FURNEAUX, 1991) por análise de CLG;

^c determinada após hidrólise ácida total por análise de CLG-MS.

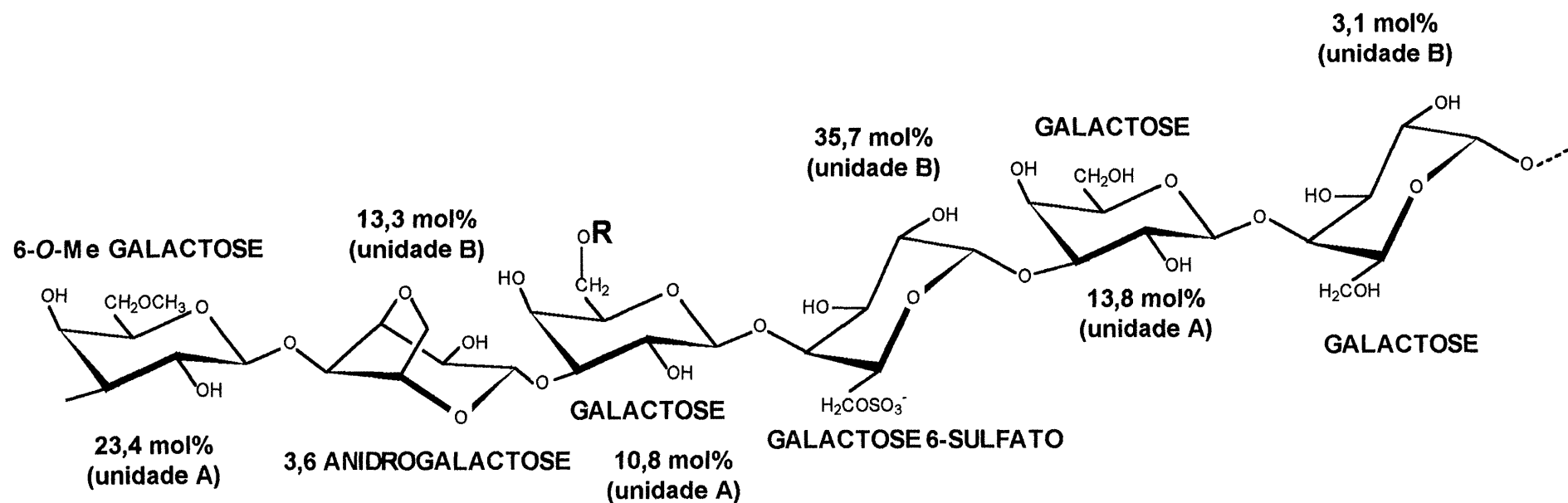


FIGURA 22: Estrutura parcialmente determinada para as porfiranas da fração PC66: mostrando a ocorrência de unidades de β -D-galactose substituídas glicosidicamente em C-1 e C-3 e por um grupo R em C-6, um provável ponto de ramificação.

Para confirmar a presença de ramificação na porfirana, assim como o tipo de ligação e anomeridade da unidade participante a fração PC66 foi submetida a hidrólise reductiva parcial, seguindo a metodologia descrita por USOV & ELASHVILI (1991), com a finalidade de obter-se oligossacarídeos representativos da estrutura original.

As condições deste tipo de hidrólise, favorecem a obtenção de oligossacarídeos, por serem fortes o suficiente para quebrarem as ligações 3,6-anidroglicosídicas mas fracas o suficiente para preservarem as demais ligações glicosídicas da molécula. Assim uma galactana como a agarose, que se encontre totalmente ciclizada, isto é, com todas as suas unidades B na forma de 3,6-anidrogalactose, dará origem apenas ao dissacarídeo com a seguinte estrutura: $[\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-L-3,6AngalOH}]$.

Desta maneira a fração PC66, inicialmente submetida ao tratamento alcalino (NaOH 1M, 80°C, 3h – NOSEDA & CERREZO, 1995), com a finalidade de promover a ciclização total de suas unidades B (PC66m₃), adquirindo assim uma estrutura simplificada, foi submetida à hidrólise reductiva parcial (USOV & ELASHVILI, 1991). O produto de hidrólise foi então submetido à cromatografia de gel permeação em BIOgel P-2 (eluída com água destilada). Através do perfil de eluição, foi possível separar quatro sub-frações oligossacarídicas, as quais foram liofilizadas e denominadas de PC66m₃-1, PC66m₃-2, PC66m₃-3 e PC66m₃-4 (FIGURA 23).

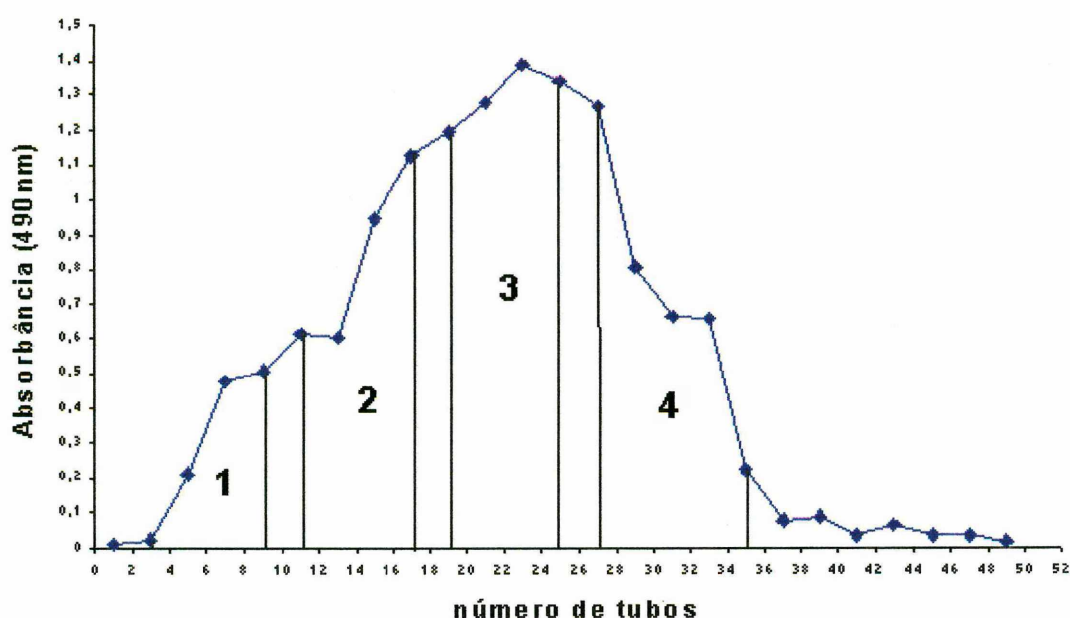


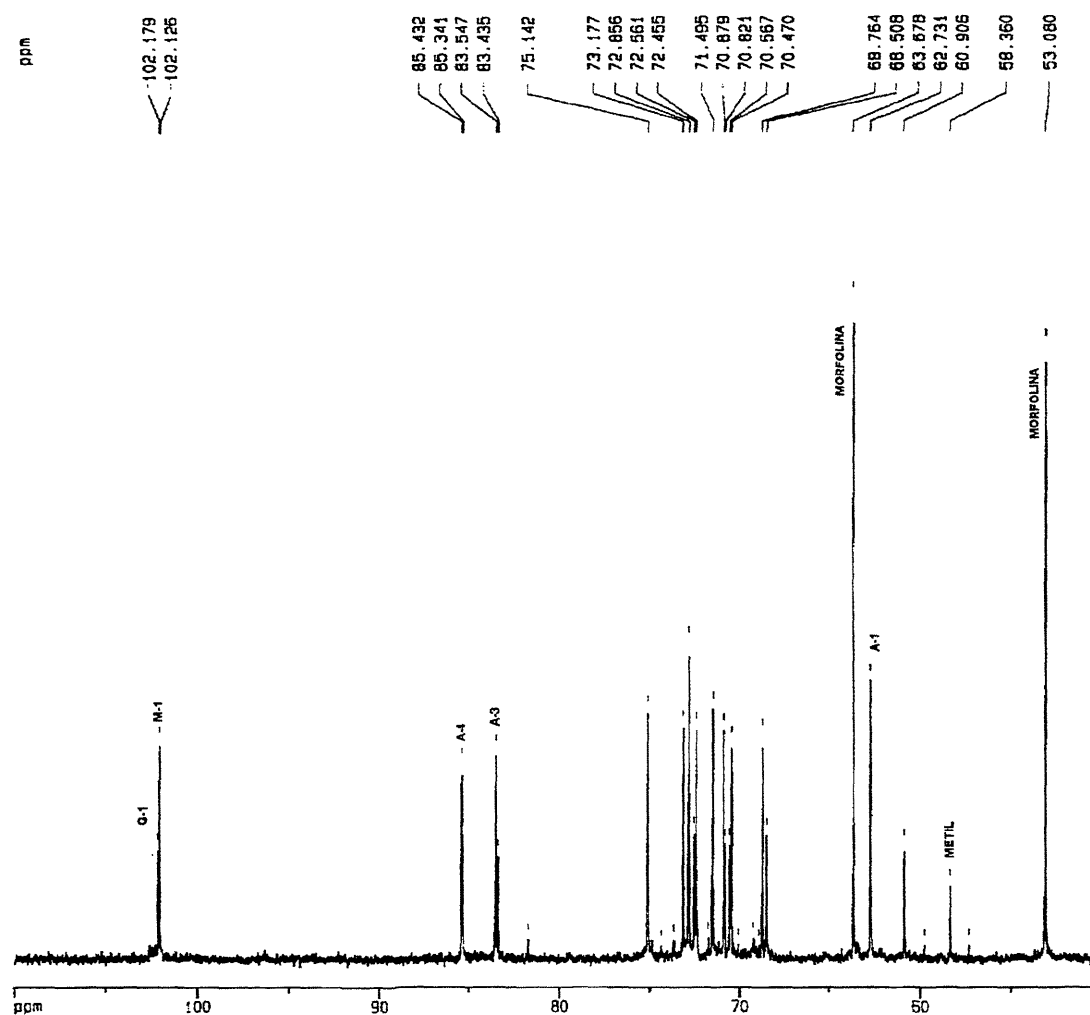
FIGURA 23: Perfil de eluição do produto de hidrólise parcial da fração PC66Bm₃ em BIOgel P-2 indicando a delimitação das sub-frações purificadas PC66m₃-1, PC66m₃-2, PC66m₃-3 e PC66m₃-4.

A sub-fração PC66m₃-1, após liofilização não mostrou um aspecto físico característico de oligossacarídeo, como o apresentado pelas demais frações, por esta razão foi reservado para posteriores análises. Já a sub-fração PC66m₃-4 mostrou-se por análises de RMN de ¹³C fortemente contaminada pelo agente redutor utilizado durante a hidrólise redutiva parcial, 4-metil morfolina borano, uma vez que os sinais característicos da morfolina foram encontrados em altas intensidades, enquanto que os sinais correspondentes a carboidratos em baixas intensidades. Ainda o espectro mostrou sinais correspondentes a unidades de β-D-galactose redutora, indicando que além das ligações 3,6-anidrogactosídicas algumas ligações β-gactosídicas também foram clivadas. Desta maneira esta fração mostrou-se desprovida de oligossacarídeos.

A fração PC66m₃-3, quando analisada por RMN de ¹³C mostrou-se constituída por oligossacarídeos. Dois sinais, praticamente sobrepostos em 102,18 e 102,13 ppm foram observados na região anomérica, sendo atribuídos ao C-1 das unidades de β-D-galactose e 6-O-metil β-D-galactose. Em 62,73 e 60,91 ppm (região dos carbonos primários) foram identificados os sinais referentes ao C-1 da unidade 3,6-anidro-L-galactitol (extremidade reduzida após a hidrólise redutiva parcial) e C-6 livre das unidades de β-D-galactose. Assim sugerindo que esta fração é constituída pela mistura de dois dissacarídeos, como confirmado pelos sinais duplos referentes aos carbonos 4 e 3 das unidades de 3,6-anidro-L-galactitol, quando substituídas glicosidicamente no carbono 4 pela unidade 6-O-metil β-D-galactose (85,43 e 83,54 ppm respectivamente) ou pela β-D-galactose (85,34 e 83,43 ppm respectivamente - FIGURA 24).

Esta fração mostrou ainda pequena contaminação por 4-metil morfolina borano, como pode ser verificado através da identificação dos sinais característicos da morfolina em 63,68 e 53,08 ppm (FIGURA 24).

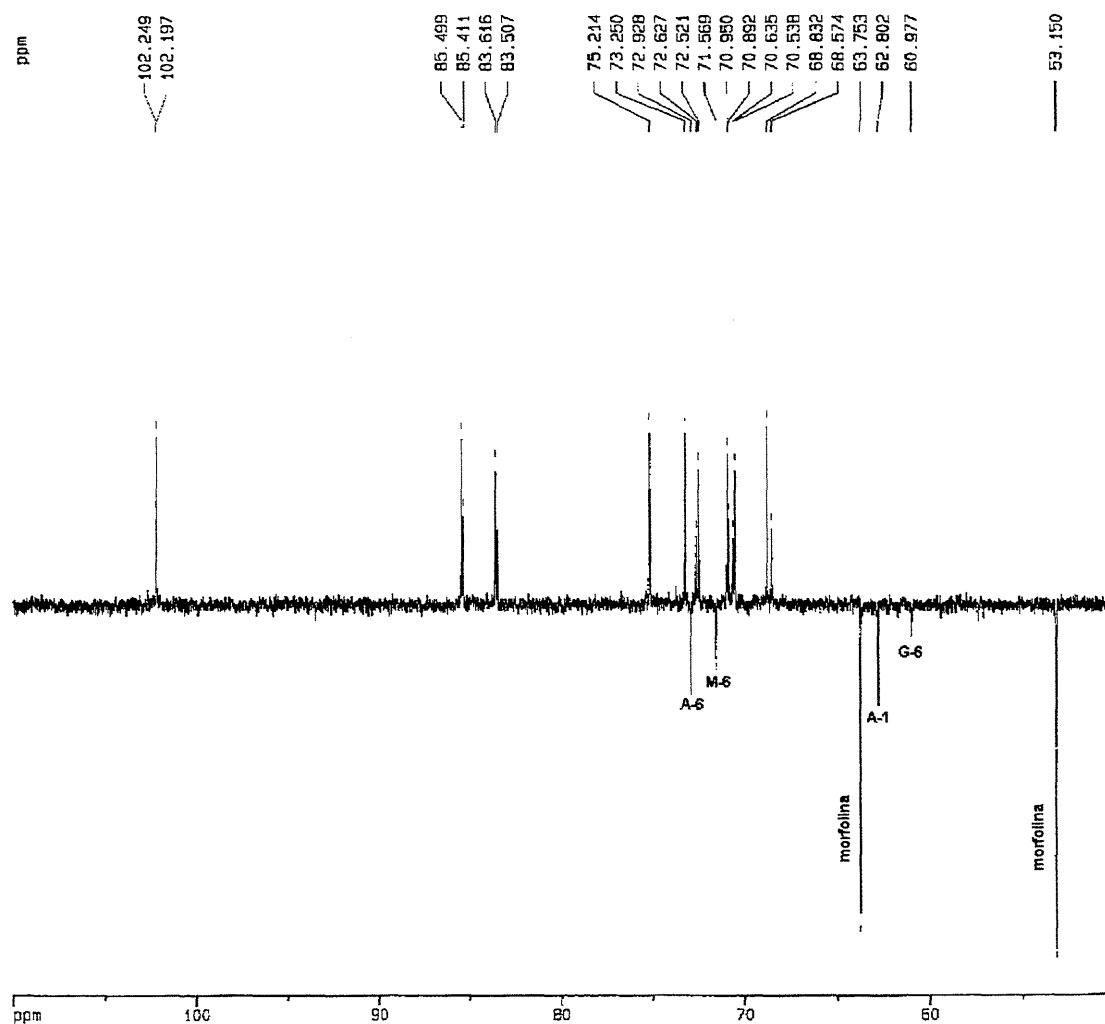
Os carbonos primários, C-6, destes dissacarídeos, os quais mostraram-se invertidos em análise de DEPT, encontram-se deslocados para campo mais baixo, em 72,93 e 71,57 ppm para a 3,6-anidro-L-galactitol e para 6-O-metil β-D-galactose respectivamente, por encontrarem-se substituídos (FIGURA 25).



G - β -D-galactopiranoose; M - 6-O-metil β -D-galactopiranoose; A - 3,6-anidro-L-galactitol.

FIGURA 24: Espectro de RMN de ^{13}C da fração PC66m₃-3 mostrando uma mistura de dois dissacarídeos devido aos sinais duplos de C-3 (83,44 e 83,55 ppm) e C-4 (85,34 e 85,43 ppm) da 3,6-anidro-L-galactitol.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).



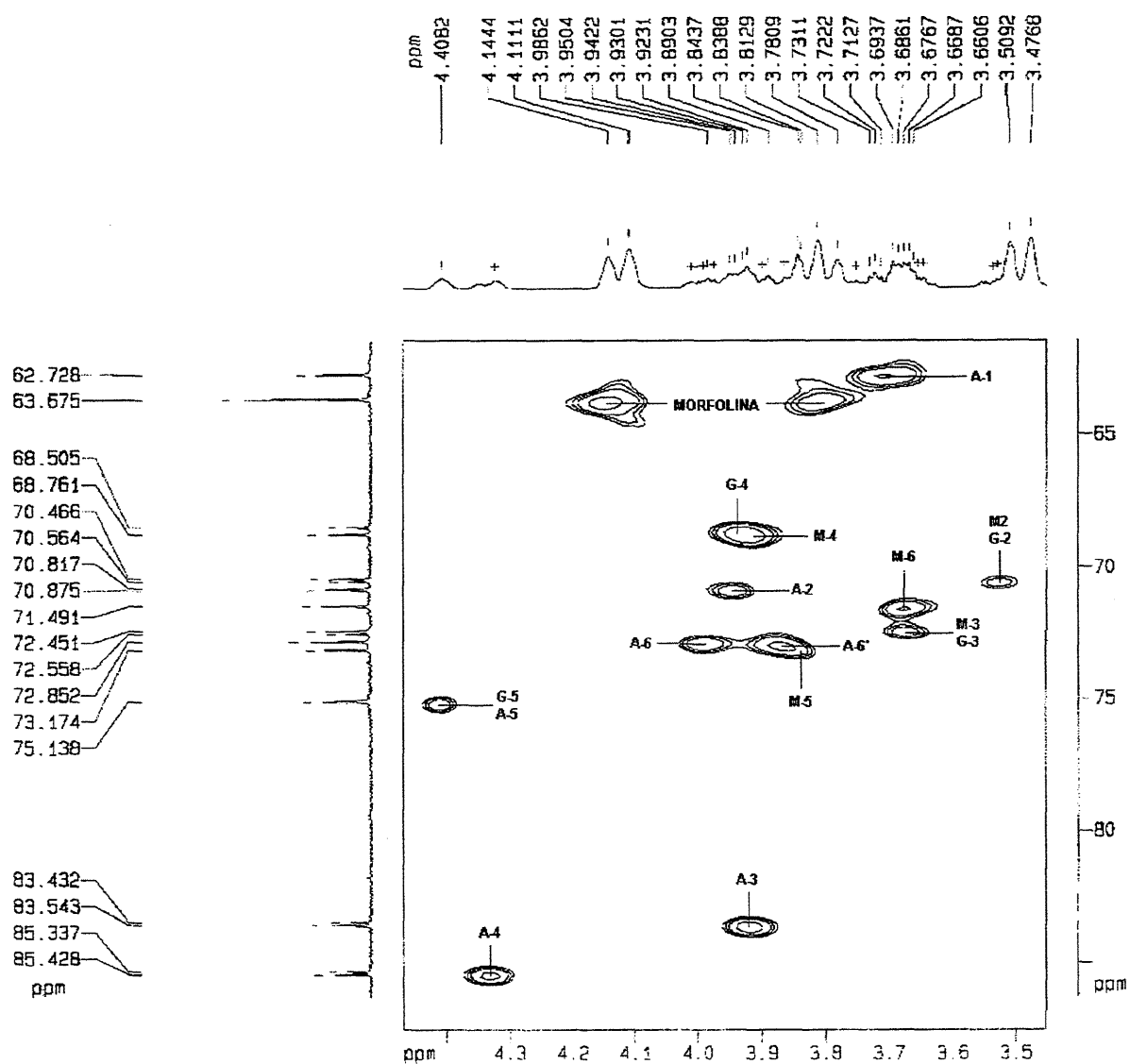
G - β -D-galactopiranoose; *M* - 6-O-metil β -D-galactopiranoose; *A* - 3,6-anidro-L-galactitol.

FIGURA 25: Espectro de RMN de ^{13}C em DEPT ($\theta_z = 135$) da fração PC66m₃-3 mostrando a inversão dos carbonos primários das unidades monossacarídicas e da morfolina.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

A partir dos deslocamentos químicos dos carbonos anoméricos (C-1) das unidades constituintes destes dissacarídeos, foi possível estabelecer suas correlações com seus respectivos prótons (H-1) através do espectro de HMQC (FIGURA 26). Estes prótons serviram então como ponto de partida para a identificação dos demais, referentes a cada unidade monossacarídica (H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6), através da análise conjunta dos espectros de COSY (H-1/H-2; H-2/H-3; etc - FIGURA 27) e TOCSY (H-1/H-2, H-1/H-3; etc - FIGURA 28), uma vez que nem todos os prótons mostraram correlações entre si. Após identificados todos os prótons, voltou-se para o espectro de HMQC para correlacioná-los aos seus respectivos carbonos (C-2, C-3, C-4 e C-5 – FIGURA 26). Assim todos os deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C e ^1H desta fração foram assinalados (TABELA 5).

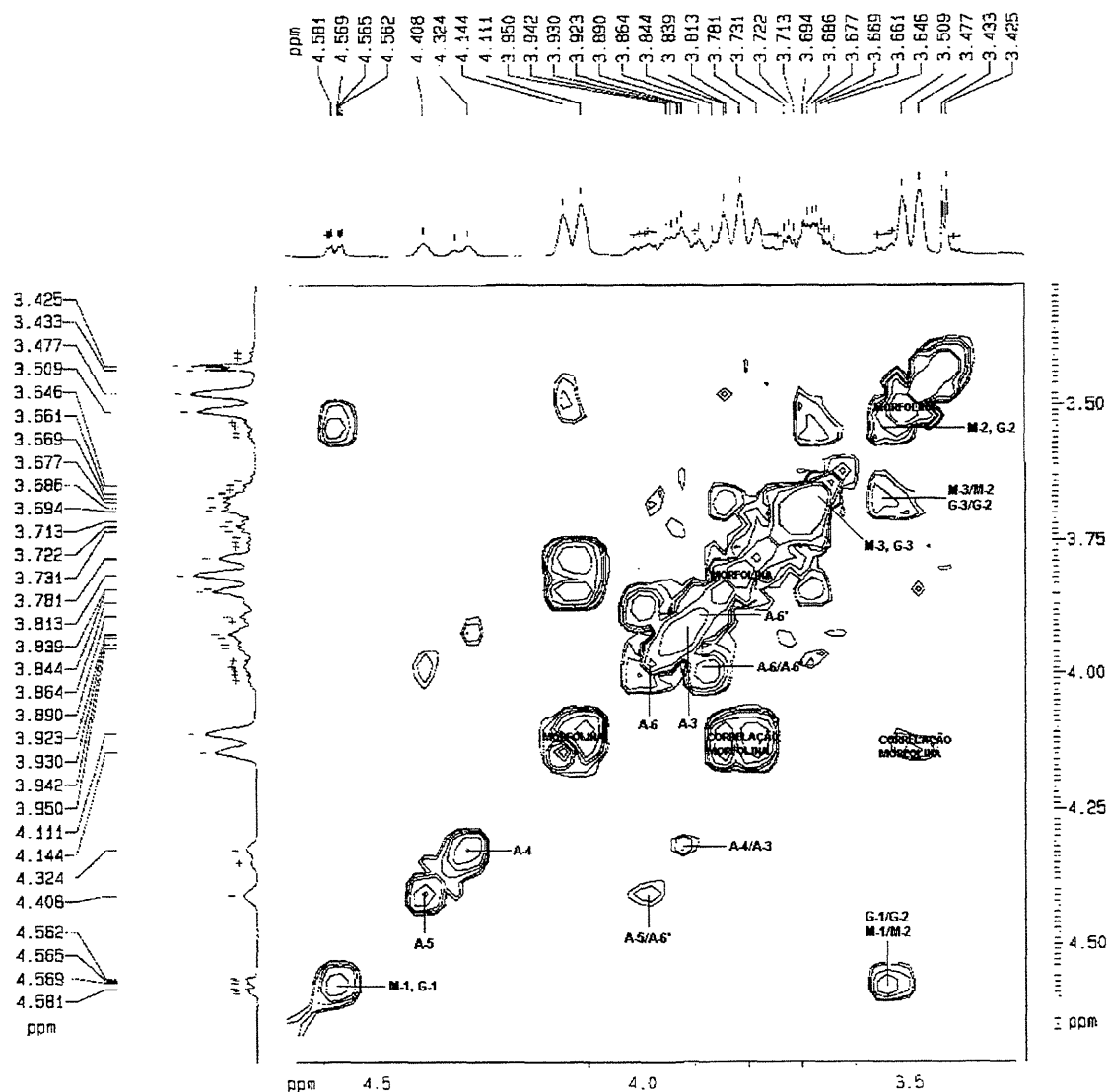
Desta maneira é possível concluir que a fração PC66m₃-3 é constituída pelos dissacarídeos agarobiitol [β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6AnGalOH] e 6-O-metil-agarobiitol [6-O-metil- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6AngalOH] (FIGURA 29).



G – correlação ^{13}C - ^1H da unidade β -D-galactopirranose; M – correlação ^{13}C - ^1H da unidade 6-O-metil- β -D-galactopirranose; A – correlação ^{13}C - ^1H da unidade 3,6-anidro-L-galactitol.

FIGURA 26: Espectro de RMN de correlação HMQC [^1H - ^{13}C] da fração PC66m₃-3.

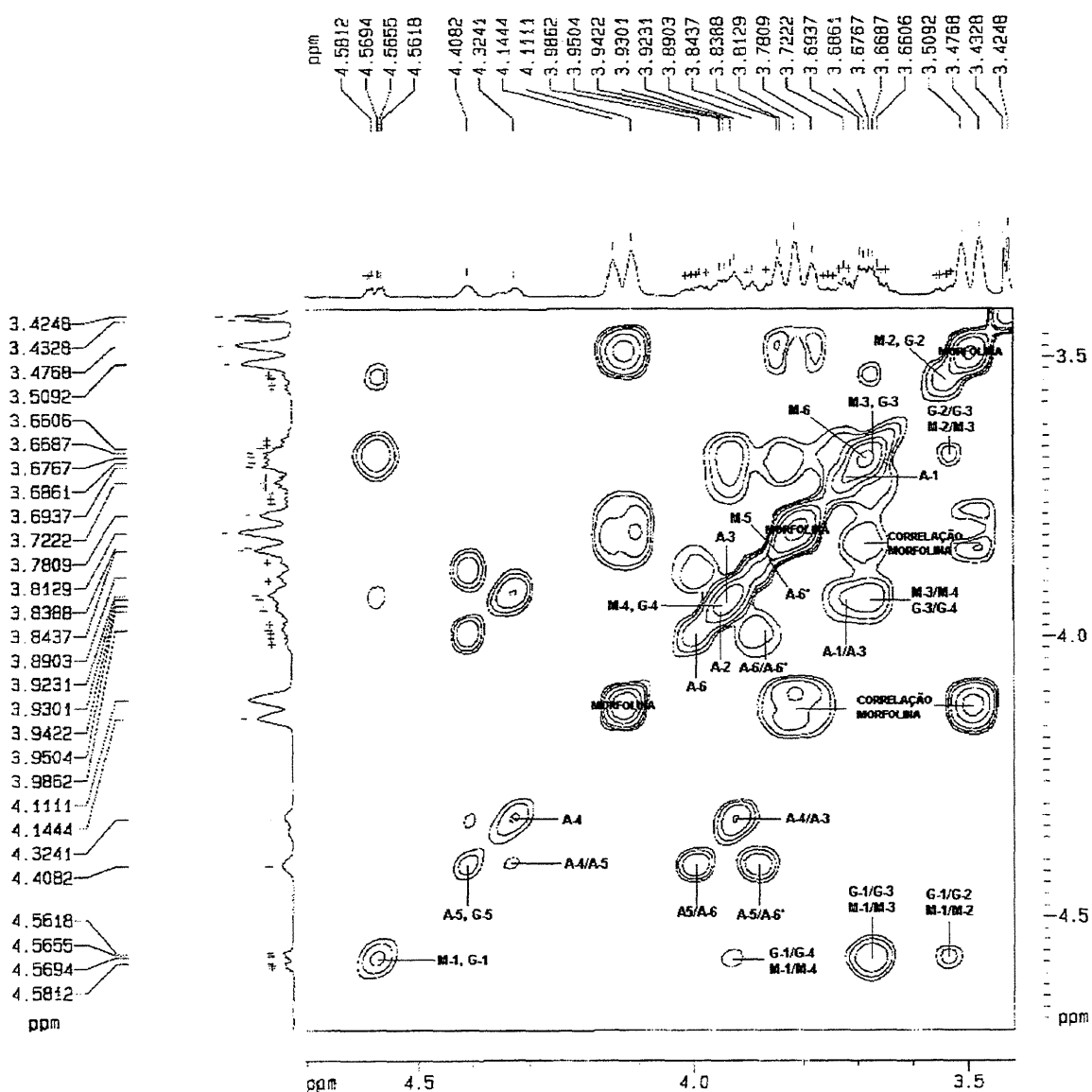
*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).



G/G – correlação ^1H - ^1H da unidade β -D-galactopiranoose; M/M – correlação ^1H - ^1H da unidade 6-O-metil- β -D-galactopiranoose; A/A – correlação ^1H - ^1H da unidade 3,6-anidro-L-galactitol.

FIGURA 27: Espectro de COSY [^1H – ^1H] da fração PC66m₃-3, mostrando a correlação entre prótons vizinhos dentro de cada unidade monossacarídica.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).



G/G – correlação ^1H - ^1H da unidade β -D-galactopiranoose; *M/M* – correlação ^1H - ^1H da unidade 6-O-metil- β -D-galactopiranoose; *A/A* – correlação ^1H - ^1H da unidade 3,6-anidro-L-galactitol.

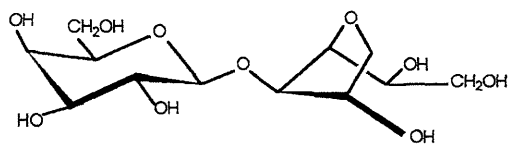
FIGURA 28: Espectro de TOCSY [$^1\text{H} - ^1\text{H}$] da fração PC66m₃-3, mostrando a correlação entre todos os prótons dentro de cada unidade monossacarídica.

*experimento realizado como descrito no ítem 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

TABELA 5: Deslocamentos químicos dos carbonos e prótons dos dissacarídeos constituintes da fração PC66m₃-3, identificados a partir de suas correlações observadas nos espectros de HMQC, COSY e TOCSY.

Unidade e carbono correspondente	Deslocamento químico (ppm)			
	agarobiitol		6-Me-agarobiitol	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
β-D-Gal (1→				
G-1	102,18	4,577		
G-2	70,56	3,532		
G-3	72,56	6,669		
G-4	68,50	3,930		
G-5	75,14	4,408		
G-6	60,91	3,799		
6-O-metil β-D-Gal (1→				
M-1			102,13	4,577
M-2			70,47	3,532
M-3			72,45	3,669
M-4			68,76	3,930
M-5			73,17	3,844
M-6			71,49	3,677
O-CH ₃			58,36	3,424
→4) 3,6-anidro-L-GalOH				
A-1	62,73	3,713	62,73	3,713
A-2	70,82	3,950	70,88	3,950
A-3	83,43	3,923	83,54	3,923
A-4	85,34	4,335	85,43	4,335
A-5	75,14	4,408	75,14	4,408
A-6	72,85	3,993	72,85	3,993
A-6'		3,890		3,890

A)

[β -D-galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6-AngalOH]

B)

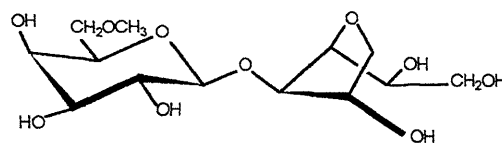
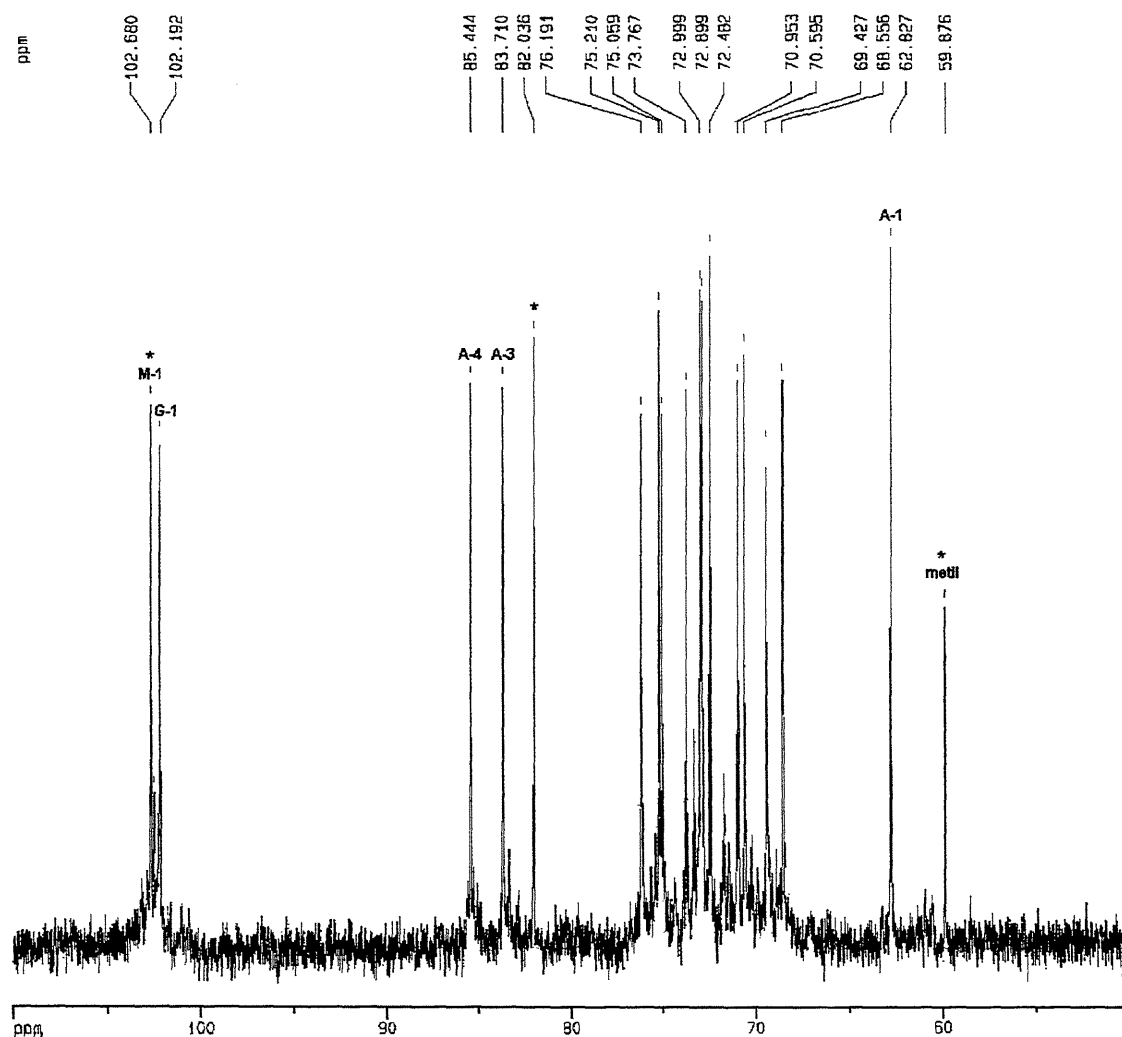
[6-O-me- β -D-galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6-AngalOH]

FIGURA 29: Estrutura química dos dissacarídeos constituintes da fração PC66m₃-3: agarobitol (A) e 6-O-metil agarobitol (B), como determinada através de técnicas de RMN.

Finalmente, a fração PC66m₃-2 foi submetida a análise de RMN de ^{13}C e ^1H para o estudo e elucidação da estrutura dos seus oligossacarídeos constituintes.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C indicou três sinais, anteriormente observados para as frações PC66 e PC66m₃, os quais foram identificados mas não assinalados durante a análise dos polissacarídeos (TABELA 3), atribuídos as unidades de β -D-galactose 6-O-substituídas e ao seu grupo substituinte indicando assim que esta estrutura fora isolada com sucesso nesta fração.

Apenas dois sinais na região anomérica, em 102,68 e 102,19 ppm, foram observados no espectro de RMN de ^{13}C e foram atribuídos aos C-1 de unidades de 6-O-metil β -D-galactopirranose e β -D-galactopirranose respectivamente (TABELA 6). Como estes oligossacarídeos foram obtidos a partir de hidrólise redutiva parcial, eles apresentam somente unidades de 3,6-anidro-L-galactitol como unidade terminal reduzida, sendo o sinal de C-1 desta unidade observado na região de carbonos primários em 62,83 ppm. Nenhum outro sinal correspondente a carbonos primários foi observado nesta região, indicando assim que o C-6 da unidade β -D-galactopirranose também esta substituído, com seu sinal químico deslocado para campo mais baixo (FIGURA 30 – TABELA 6).



G - β -D-galactopiranoose; M - 6-O-metil β -D-galactopiranoose; A - 3,6-anidro-L-galactitol.

* sinais também observados na fração PC66m₃.

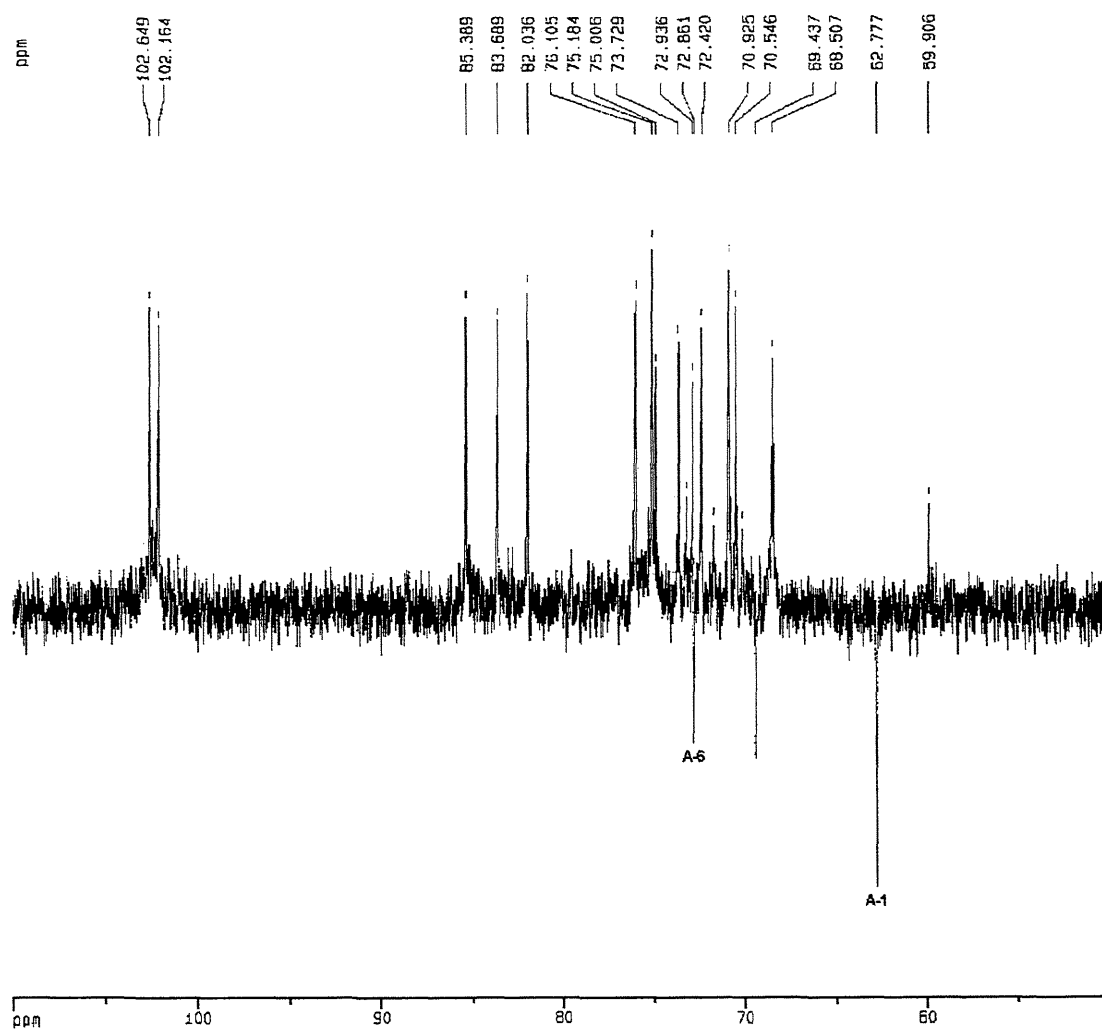
FIGURA 30: Espectro de RMN de ^{13}C da fração PC66m₃-2, os sinais em 102,68, 82,04, 73,33 e 59,88 ppm foram observados anteriormente na fração PC66m₃ e referem-se a um grupo substituinte de natureza glicosil.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

O espectro de DEPT da fração PC66m₃-2 contém apenas três sinais invertidos, dois deles, em 62,78 e 72,86 ppm, correspondem aos carbonos 1 e 6 das unidades de 3,6-anidro-L-galactitol, como determinado para os dissacarídeos constituintes da fração PC66m₃-3. O terceiro sinal, em 69,44 ppm, provavelmente correspondente a uma superposição dos C-6 das unidades 6-O-metil β -D-galactose e β -D-galactose (FIGURA 31).

Estas observações suportam a idéia de que o oligossacarídeo constituinte desta fração é um trissacarídeo formado por unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranoose, β -D-galactopiranoose e 3,6-anidro-L-galactitol.

Estes resultados estão de acordo com a análise de metilação obtida para o polissacarídeo nativo, onde identificou-se entre outros, o derivado 2,4-di-O-metil-galactose, o qual como mencionado anteriormente, é formado a partir das unidades de β -D-galactopiranoose 3 e 6-O-sustituída. Ainda, a ausência de um derivado tetrametilado, o qual deveria ser formado a partir das unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranoose (como ramificações), sugere que esta unidade possa também estar substituída em algum outro carbono, provavelmente em 4, devido a identificação do derivado trimetilado em ambas as frações 2,3,6-tri-O-metil-galactose.



G - β -D-galactopiranoose; *M* - 6-O-metil β -D-galactopiranoose; *A* - 3,6-anidro-L-galactitol.

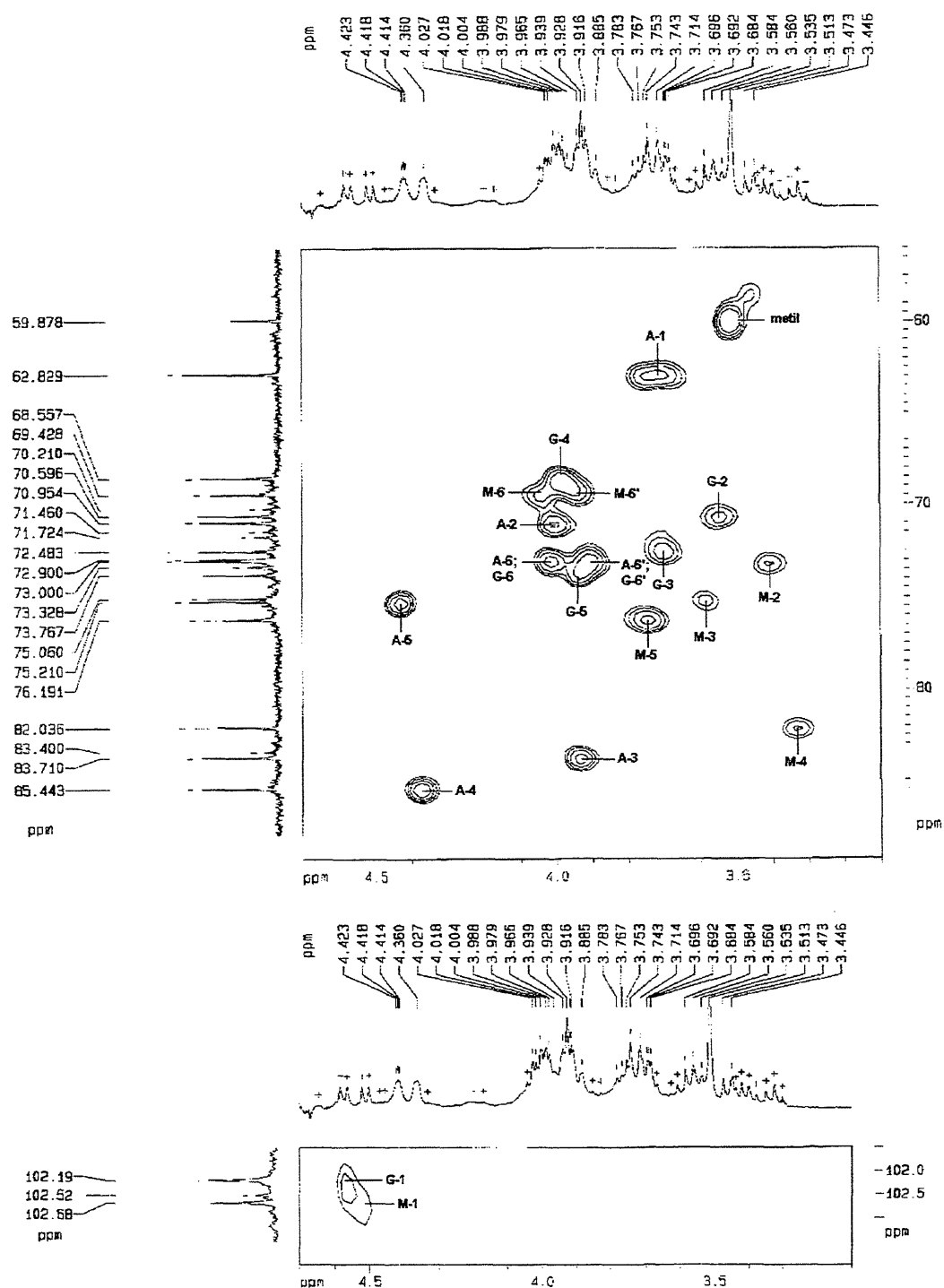
FIGURA 31: Espectro de RMN de ^{13}C em DEPT ($\theta_z = 135$) da fração PC66m₃-2 mostrando a inversão de três sinais.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

Todos os carbonos e prótons das unidades constituintes deste trissacarídeo tiveram seus deslocamentos químicos assinalados (TABELA 6) com auxílio das técnicas bidimensionais de RMN, HMQC (FIGURA 32), COSY (FIGURA 33) e TOCSY (FIGURA 34) com a mesma sequência metodológica empregada para a fração anterior e por comparação com os dissacarídeos constituintes da fração PC66m₃-3.

Estas análises mostraram que o sinal correspondente ao C-6 da unidade β -D-galactopiranosose 6-O-substituída se encontra superposto ao da unidade de 3,6-anidro-L-galactitol (72,90 ppm) e não ao da unidade de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose (69,43 ppm), como inicialmente suspeitava-se. Ainda confirmaram que o C-4 das unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose se encontra substituído, uma vez que o seu sinal encontra-se deslocado para um campo mais baixo (82,04 ppm) na região característica dos carbonos substituídos, juntamente com os carbonos 3 e 4 da unidade de 3,6-anidro-L-galactitol. Tal grupo substituinte não pode ser metil, pois não existe sinal característico deste grupo, da mesma forma não podendo ser considerado a presença de um grupo glicosil. Por estas razões conclui-se que a unidade 6-O-metil- β -D-galactopiranosose esta substituída em carbono 4 por um grupo sulfato.

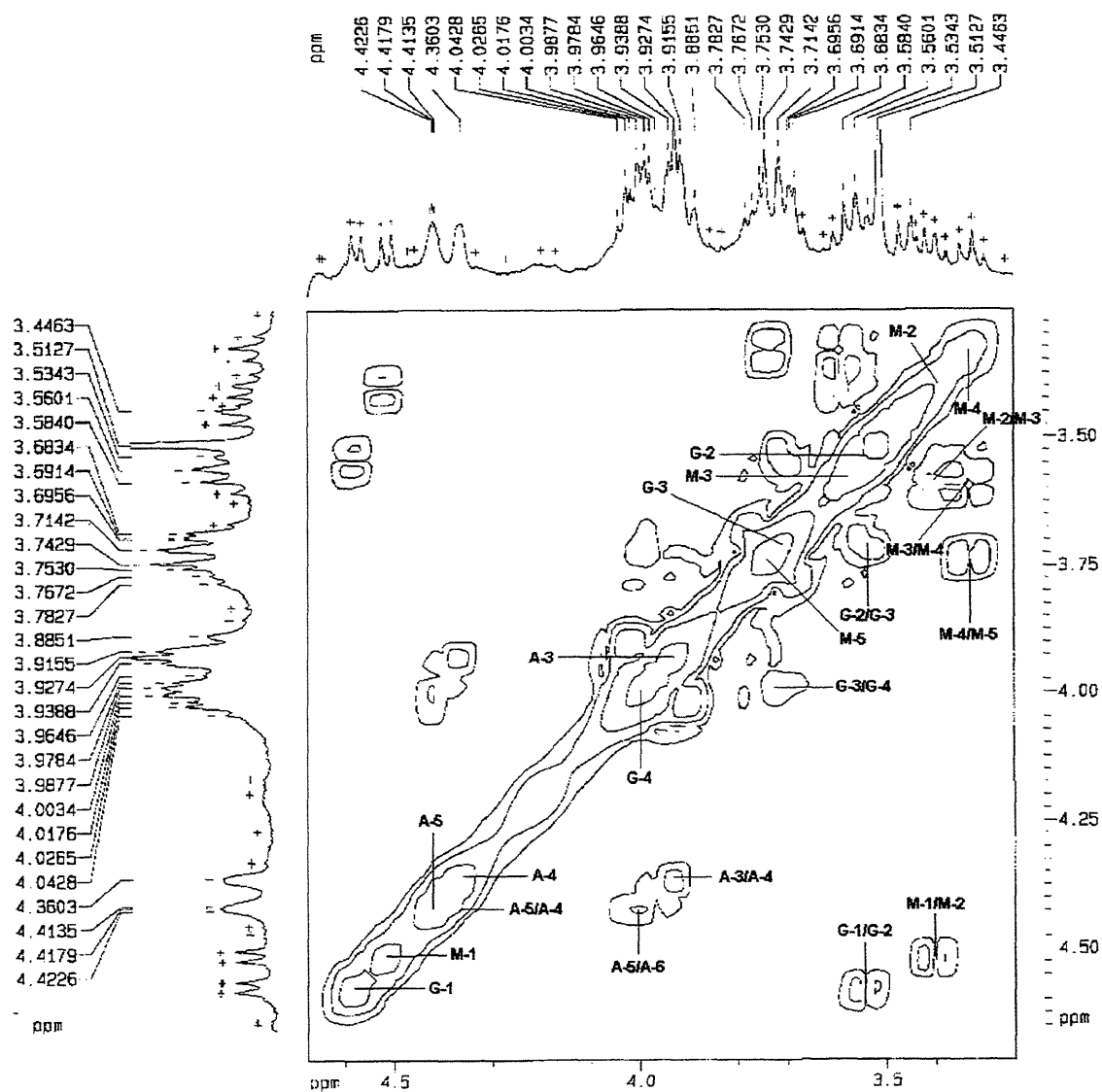
Assim é possível concluir que a fração PC66m₃-2 é constituída por um trissacarídeo com a seguinte estrutura química [6-O-me- β -D-Galp-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6-AnGalOH] (FIGURA 35).



G – β -D-galactopiranosose; M – 6-O-metil- β -D-galactopiranosose; A – 3,6-anidro-L-galactitol.

FIGURA 32: Espectro de correlação de HMQC $[^1\text{H} - ^{13}\text{C}]$ da fração PC66m₃-2.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).



G/G – correlação ^1H - ^1H da unidade β -D-galactopirranose; M/M – correlação ^1H - ^1H da unidade 6-O-metil- β -D-galactopirranose; A/A – correlação ^1H - ^1H da unidade 3,6-anidro-L-galactitol.

FIGURA 33: Espectro de COSY [^1H – ^1H] da fração PC66m₃-2 mostrando a correlação entre prótons vicinais dentro de cada unidade monossacarídica.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

FIGURA 34: Espectro de TOCSY [^1H - ^1H] da fração PC66m₃-2, mostrando a correlação entre todos os prótons dentro de cada unidade monossacarídica.

*experimento realizado como descrito no item 3.3.9. de materiais e métodos (pág. 40).

TABELA 6: Deslocamentos químicos dos carbonos e prótons do trissacarídeo constituinte da fração PC66m₃-2, identificados a partir dos espectros de HMQC, COSY e TOCSY.

Unidade e carbono correspondente	Deslocamento químico (ppm)	
	¹³ C	¹ H
→6) β-D-galactose (1→		
C-1	102,19	4,573
C-2	70,59	3,56
C-3	72,48	3,71
C-4	68,56	3,98
C-5	73,77	3,93
C-6	72,90	4,00; 3,88
6-O-metil β-D-galactose (→1		
C-1	102,68*	4,51
C-2	72,99	3,40
C-3	75,06	3,58
C-4	82,04*	3,32
C-5	76,19	3,74
C-6	69,43	4,03; 3,94
O-CH ₃	59,88*	3,51
→4) 3,6-anidro-L-galactitol		
C-1	62,83	3,75; 3,67
C-2	70,95	4,00
C-3	83,71	3,92
C-4	85,44	4,36
C-5	75,21	4,42
C-6	72,90	4,00; 3,88

*mesmos sinais identificados no espectro de RMN de ¹³C da fração PC66m₃ (tabela 3 – pág. 61), os sinais em 73,85; 73,49 e 68,85 ppm não foram observados aqui.

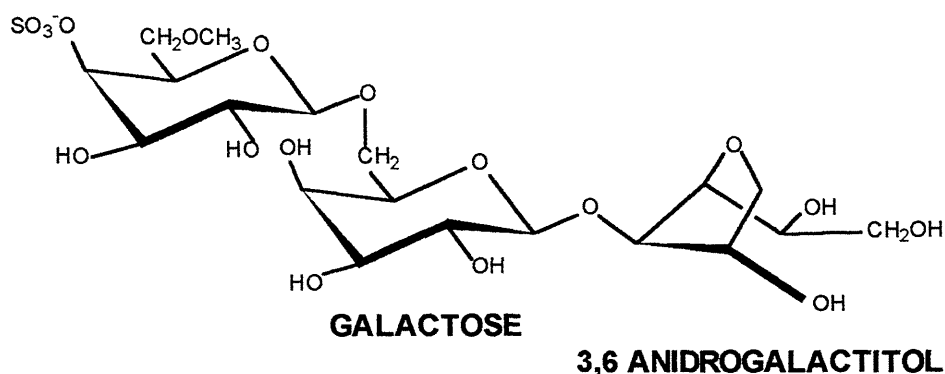
6-O-METIL GALACTOSE 4-SULFATO

FIGURA 35: Trissacarídeo constituinte da fração PC66m₃-2, formado por unidades de 6-O-metil-β-D-galactopiranosose, β-D-galactopiranosose e 3,6-anidro-L-galactose com a seguinte estrutura: [6-O-me-β-D-Galp-4-sulfato-(1→6)-β-D-Galp-(1→4)-L-3,6-AnGalOH], estando as unidades de 6-O-metil β-D-galactose substituídas em C-4.

As porfiranas extraídas da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne estudadas anteriormente por BRASCH *et al.*, (1981) e por VILLARROEL & ZANLUNGO (1981) foram caracterizadas como galactanas sulfatadas de cadeia linear, com unidades alternantes de β-D-galactose ou 6-O-metil β-D-galactose substituídas glicosidicamente em carbono 3 (unidade A) e de α-L-galactose 6-sulfato ou 3,6-anidro α-L-galactose substituídas glicosidicamente em carbono 4 (unidade B). Nenhum grupo sulfato ou acetal de ácido pirúvico foi detectado esterificando qualquer outro carbono no polissacarídeo. Estes mesmos autores mencionaram uma possibilidade de ramificação na cadeia, em carbono 3 ou 4, mas que não foram confirmadas.

Por outro lado as porfiranas constituintes da fração PC66, também isolada da alga vermelha *Porphyra columbina*, estudadas neste trabalho mostraram uma estrutura nova, nunca anteriormente descrita para esta ou outras espécies

pertencentes aos gêneros *Porphyra* ou *Bangia*, constituída por uma cadeia principal formada por unidades alternantes de β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose substituídas glicosidicamente em carbono 3 e por α -L-galactose 6-sulfato e/ou 3,6-anidro α -L-galactose substituídas glicosidicamente em carbono 4, parcialmente ramificadas em carbono 6 das unidades de β -D-galactose por 6-O-metil β -D-galactose 4-sulfato (FIGURA 36).

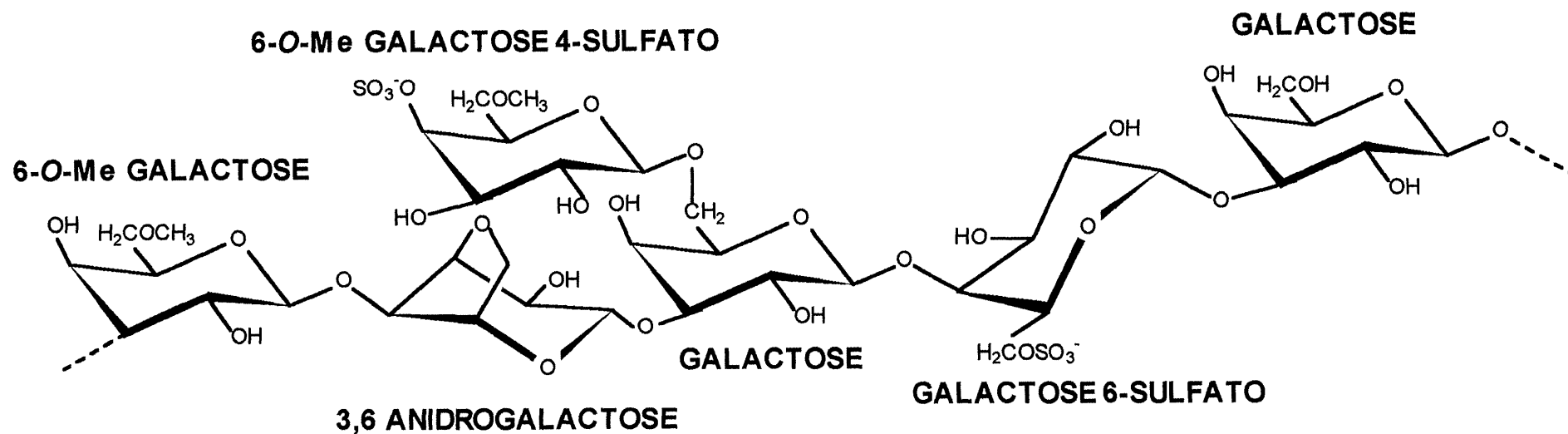


FIGURA 36: Estrutura não usual determinada para as porfiranas constituintes da fração PC66, isoladas da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne, contendo unidades de β -D-galactose como ponto de ramificação para unidades de 6-O-metil β -D-galactose 4-sulfato.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne foi isolada uma fração polissacarídica denominada PC66, constituída por unidades de β -D-galactose (63,3 mol%), 6-O-metil β -D-galactose (23,4 mol%) e 3,6-anidro- α -L-galactose (13,3 mol%), com uma rotação óptica específica de $-46,4^\circ$, caracteristicamente uma agarana do tipo porfirana;
- Por hidrólise redutiva parcial obteve-se uma variedade de oligossacarídeos, os quais isolados e caracterizados por técnicas mono e bidimensionais de ressonância magnética nuclear, como:
 - agarobiitol [β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6-AnGalOH]
 - 6-O-metil agarobiitol [6-O-me- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6-AnGalOH]
 - [6-O-me- β -D-Galp-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-L-3,6-AnGalOH]
- A ocorrência deste trissacarídeo, entre os produtos de hidrólise parcial, demonstra que a porfirana apresenta uma estrutura não usual, formada por uma cadeia principal de unidades 3-O-ligadas (β -D-galactose e/ou 6-O-metil β -D-galactose) alternadas com unidades 4-O-ligadas (α -L-galactose 6-sulfato e/ou 3,6-anidro- α -L-galactose), parcialmente ramificadas em carbono 6 das unidades de β -D-galactose por 6-O-metil β -D-galactose 4-sulfato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, N.S. & REES, D.A. Porphyran: a polysaccharide with a masked repeating structure. **J. Chem. Soc.:** 5880-5887 (1965).

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

ASPINALL, G.O. (2^a Ed.) **The Polysaccharides**, Vol. 2, Academic Press, New York. pp 195-285 (1982).

BALDAN, B.; ANDOLFO, P.; CULOSO, F.; TRIPODI, G. & MARIANI, P. Polysaccharide localization in the cell wall of *Porphyra leucosticta* (Bangiophyceae, Rhodophyta) during the life cycle. **Bot. Mar.**, **38**: 31-36 (1995).

BRASCH, D.J.; CHANG, H.M.; CHUAH, C.T. & MELTON, L.D. The galactan from the edible red alga *Porphyra columbina*. **Carbohydr. Res.**, **97**: 113-125 (1981).

CIANCIA, M. Estudio de los carragenanos de plantas cistocarpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii*. **Tesis de doutorado**. Departamento de Química Orgánica, Universidad de Buenos Aires, 307pp. (1994).

CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C. & CEREZO, A.S. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. **Carbohydr. Polym.**, **20**: 95-98 (1993).

CIUCANU, I. & KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, **131**: 209-217 (1984).

CROWE, J.; CROWE, L.; CARPENTER, J. & WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochem. J.**, **242**: 1-10 (1987).

DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochem. J.**, **78**: 312-319 (1961).

DODGSON, K.S. & PRICE, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, **84**: 106-110 (1962).

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**: 350-356 (1956).

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. & STEVENSON, D.E. Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, **308**: 107-115 (1998).

GRETZ, M.R. & McCANDLESS, E.L. The galactan sulphates of the conchocelis phases of *Porphyra leucostricta* and *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta). **J. Experim. Bot.**, **34(143)**: 705-711 (1983).

GRETZ, M.R.; SOMMERFELD, M.R. & ARONSON, J.M. Cell wall composition of the generic phase of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta). **Bot. Mar.**, **25**: 529-535 (1982).

GUISELEY, K.B. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. **Carbohydr. Res.**, **13**: 247-256 (1970).

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDEBERG, B. & LONNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**, **8**: 1-71 (1976).

KANDLER, O & HOPF, H. Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. (eds.). **The biochemistry of plants a comprehensive treatise – Carbohydrates: structure and function**, New York: Academic Press, v. 3: 221-226 (1980).

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

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

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

KIRST, G.O. Low molecular weight carbohydrates and Ions in Rhodophyceae: quantitative measurement of floridoside and digeneaside. **Phytoch.**, **19**: 1107-1110 (1980).

KLOAREG, B. & QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, **26**: 259-315 (1988).

LEE, R.E. **Phycology**, Second edition. Cambridge University Press, Cambridge. 645pp (1989).

McCANDLESS, E.L. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **30**: 41-53 (1979).

MENG, J.; ROSELL, K.G. & SRIVASTAVA, L.M. Chemical characterization of floridoside from *Porphyra perforata*. **Carbohydr. Res.**, **161**: 171-180 (1987).

MORRICE, L.M.; McLEAN, M.W.; LONG, W.F. & WILLIAMSON, F.B. Porphyrans primary structure: an investigation using β -agarase I from *Pseudomonas atantica* and ^{13}C -NMR spectroscopy. **Eur. J. Biochem.**, **133**: 673-684 (1983).

MUKAI, L.S. & CRAIGIE, J.S. Chemical composition and structure of the cell walls of the conchocelis and thallus phases of *Porphyra tenera* (Rhodophyceae). **J. Phycol.**, **17**: 192-198 (1981).

NOSEDA, M.D.; CAUDURO, J.P.; DUCATTI, D.R.B. & DUARTE, M.E.R. Chemical structure of the sulfated polysaccharides extracted from the red seaweed *Acatophora spicifera*. **Proceed. Third Int. Symp. Nat. Polym.** 176-180 (2000) - a.

NOSEDA, M.D. & CEREZO, A.S. Alkali-modification of carrageenans. II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated β -D-galactose units. **Carbohydr. Polym.** **26**: 1-3 (1995).

NOSEDA, M.D.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R. & CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. **Carbohydr. Polym.** **42**: 301-305 (2000) - b.

NOSEDA, M.D. Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales). **Tese de doutorado**. Departamento de Bioquímica da UFPR, 180pp. (1994).

PAINTER, T.J., in ASPINALL, G.O. (Ed.) **The Polysaccharides**, Vol. 2, Academic Press, New York. pp 195-285 (1982).

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 5^o edição. Guanabara/Koogan, Rio de Janeiro. pp 248-259 (1996).

REES, D.A. & CONWAY, E. The structure and biosynthesis of porphyrin: a comparison of some samples. **Biochem. J.**, **84**: 411-416 (1969).

SOUTH, G.R. & WHITTICK, A. **Introduction to Phycology**, First publication. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 341pp. (1987).

STEVENSON, T.T. & FURNEAUX, R.H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydr. Res.**, **210**: 277-298 (1991).

STORTZ, C.A. & CEREZO, A.S. The systems of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridaea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions. **Carbohydr. Res.**, **242**: 217-227 (1993).

USOV, A. I. & ELASHVILI, Y. A. Polysaccharides of algae: 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using partial reductive hydrolysis. **Bot. Mar.**, **34**: 553-560, (1991).

USOV, A.I. & IVANOVA, E.G. Polysaccharides of algae XXXVII. characterization of hybrid structure of substituted agarose from *Polysiphonia morrowii* (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using β -agarase and ^{13}C -NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, **30**: 365-370 (1987).

USOV, A.I. NMR Spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans. **Bot. Mar.**, **27**: 189-202 (1984).

USOV, A.I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocol.**, **12**: 301-308 (1998).

USOV, A.I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocol.**, **6**: 9-23 (1992).

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G. & JAHNS, H.M. **ALGAE, An introduction to phycology**, First edition. Cambridge University Press, Cambridge. 627pp. (1989).

VILLARROEL, L.H. & ZANLUNGO, A.B. Structural studies on the porphyran from *Porphyra columbina* (Montagne). **Carbohydr. Res.**, **88**: 139-145 (1981).

ZINOUN, M.; DIOURIS, M.; POTIN, P.; FLOC'H, J.Y. and DESLANDES, E.
Evidence of sulfohydrolase activity in the red alga *Calliblepharis jubata*. **Bot.**
Mar., **40**: 49-53 (1997).

ANEXOS

Current Data Parameters
 NAME 10PC66m3-3
 EXPNO 5
 PROCNO 1

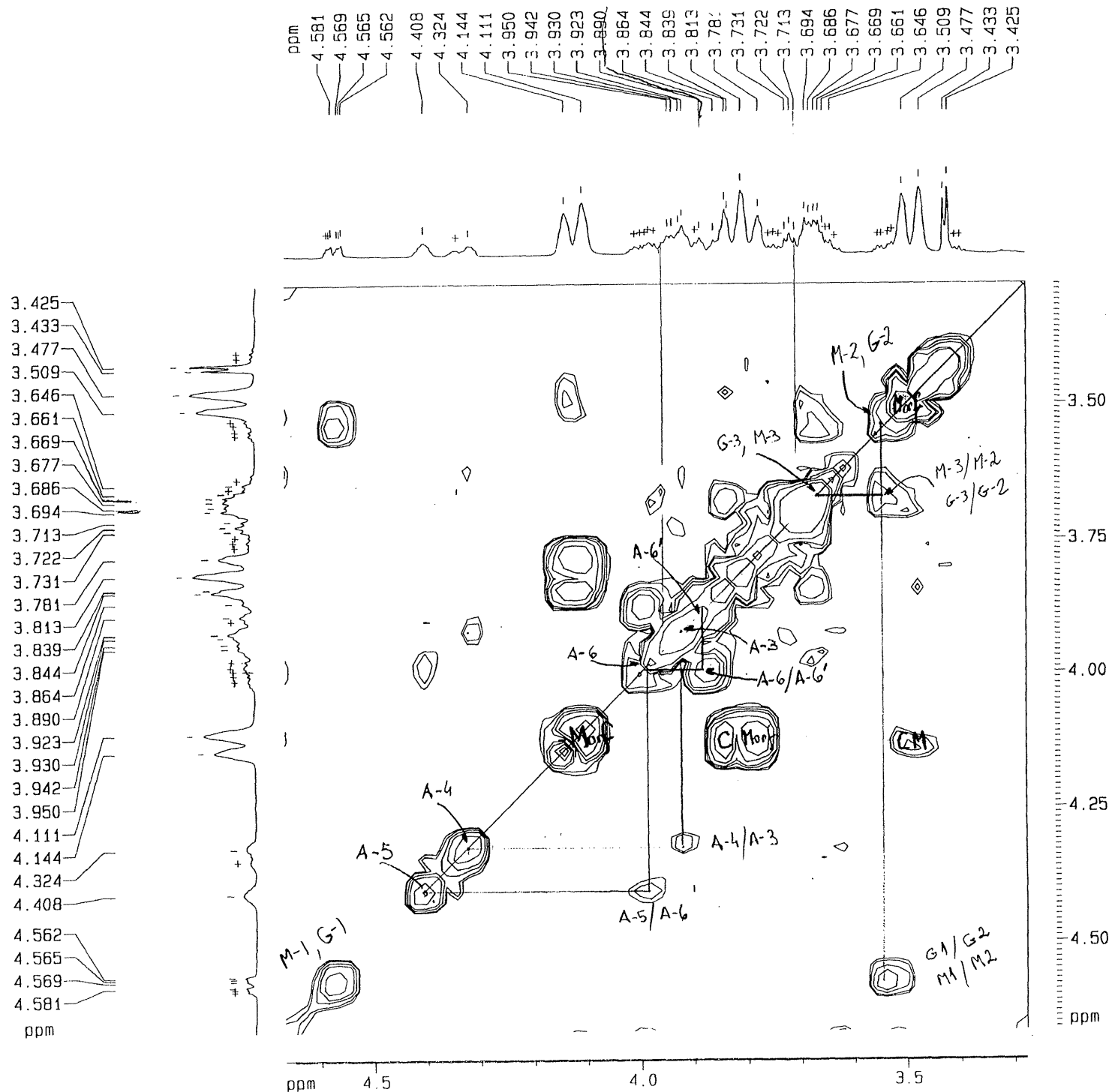
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 500000
 Time 6.53
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG cosypr
 TD 512
 SOLVENT D2O
 NS 4
 DS 32
 SWH 4125.413 Hz
 FIDRES 8.057446 Hz
 AQ 0.0621044 sec
 RG 4096
 DW 121.200 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 D11 0.03000000 sec
 D12 0.0002000 sec
 PL9 62.00 dB
 D1 2.00000000 sec
 SFO1 400.1318782 MHz
 NUC1 1H
 PL1 -3.00 dB
 D13 0.00000300 sec
 P1 6.70 usec
 D0 0.00000300 sec
 P0 6.70 usec
 DE 4.50 usec
 INO 0.00024240 sec

F1 - Acquisition parameters
 NDO 1
 TD 512
 SFO1 400.1319 MHz
 FIDRES 8.057446 Hz
 SW 10.310 ppm

F2 - Processing parameters
 SI 512
 SF 400.1300021 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F1 - Processing parameters
 SI 512
 MC2 OF
 SF 400.1300050 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0

2D NMR plot parameters
 CX2 13.00 cm
 CX1 13.00 cm
 F2PLO 4.669 ppm
 F2LO 1869.06 Hz
 F2PH1 3.279 ppm
 F2H1 1312.09 Hz
 F1PLO 4.668 ppm
 F1LO 1867.70 Hz
 F1PH1 3.278 ppm
 F1H1 1311.73 Hz
 F2PPMCM C 10688 ppm/cm
 F2H1/CM C 16645 Hz/cm
 F1PPMCM C 10688 ppm/cm
 F1H1/CM C 16645 Hz/cm

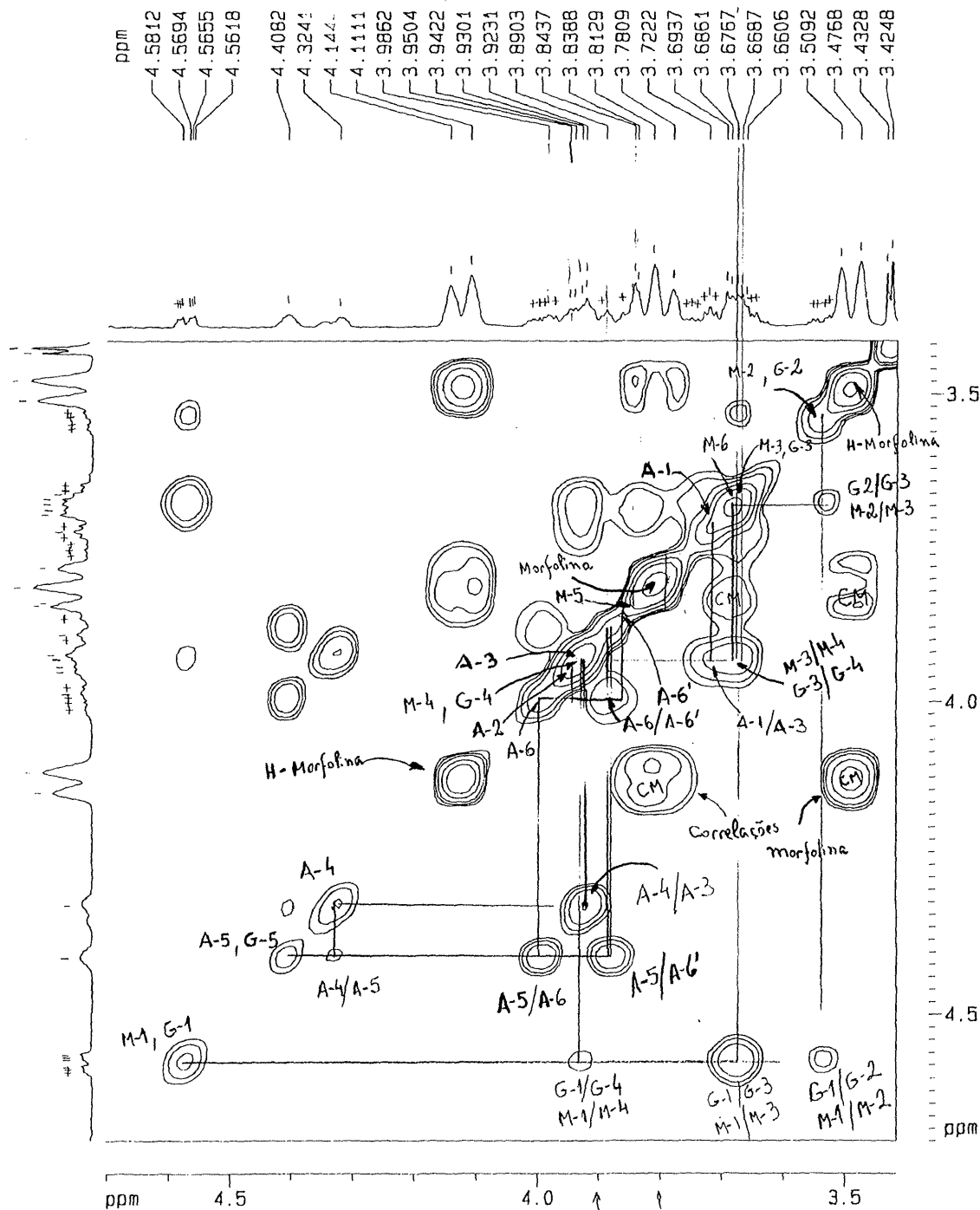


PC66m3-3 cosy

Tocsy

3.4248
3.4328
3.4768
3.5092
3.6606
3.6687
3.6767
3.6861
3.6937
3.7222
3.7809
3.8129
3.8388
3.8437
3.8903
3.9231
3.9301
3.9422
3.9504
3.9862
4.1111
4.1444
4.3241
4.4082

4.5618
4.5655
4.5694
4.5812
ppm



Current Data Parameters
NAME 10PC66m3-3
EXPNO 6
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 500000
Time 8.08
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinu
PULPROG mievprlp
TD 512
SOLVENT D2O
NS 4
DS 16
SWH 4084.967 Hz
FIDRES 7.978452 Hz
AQ 0.0627188 sec
RG 8
DM 122.400 usec
DE 4.50 usec
TE 300.0 K
O11 0.03000000 sec
O12 0.00002000 sec
PL9 62.00 dB
O1 2.00000000 sec
SFO1 400.1310782 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB
O13 0.00000300 sec
P1 6.70 usec
O0 0.00000300 sec
PL10 10.00 dB
P17 2500.00 usec
P6 38.10 usec
P7 76.20 usec
L1 28
P5 25.15 usec
DE 4.50 usec
IN0 0.00012240 sec

F1 - Acquisition parameters
N00 2
TD 467
SFO1 400.1319 MHz
FIDRES 8.747253 Hz
SN 10.209 ppm

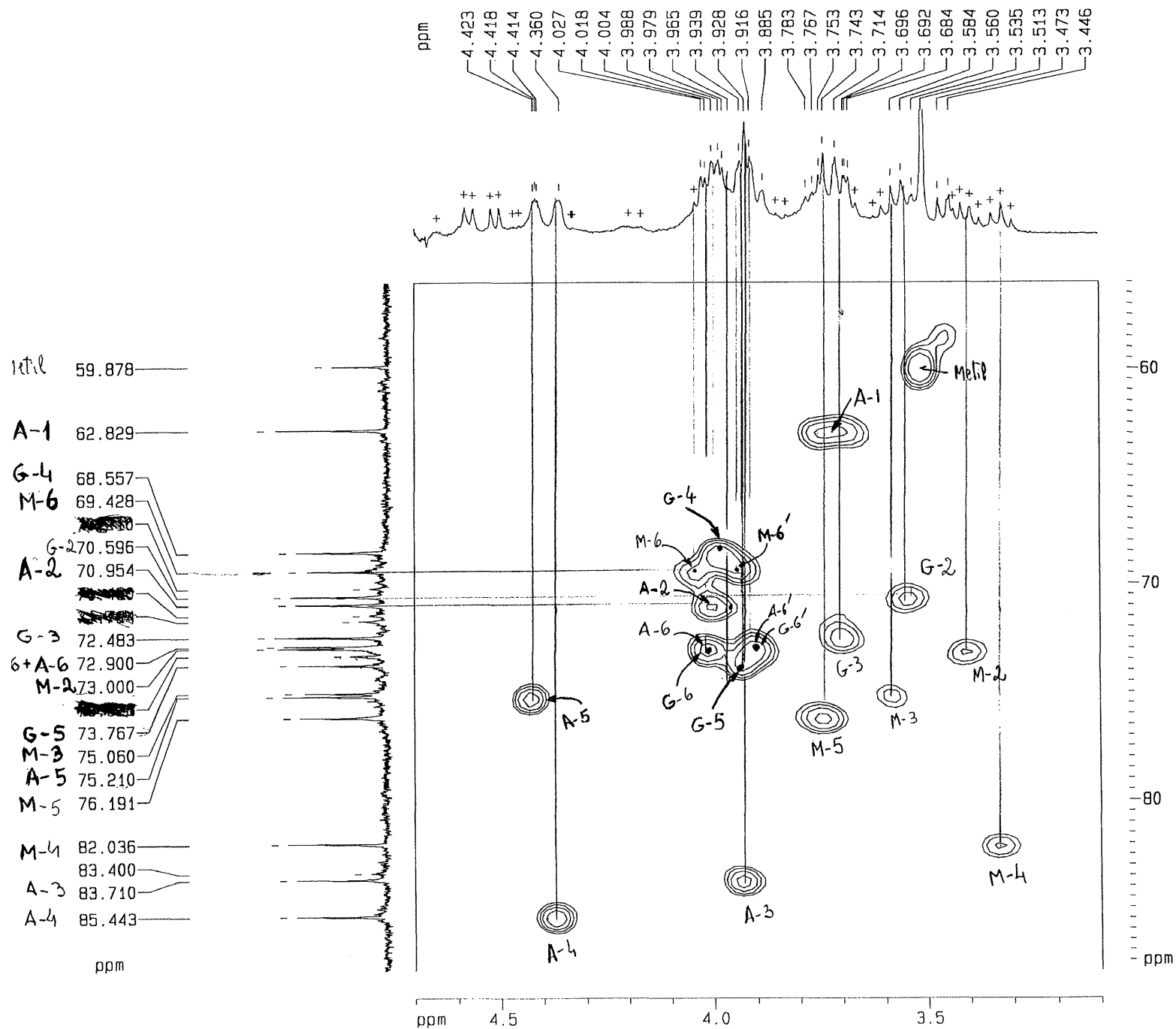
F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.1300050 MHz
WDW SINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
NC2 TPPI
SF 400.1300080 MHz
WDW SINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0

2D NMR plot parameters
CX2 12.00 cm
CX1 12.00 cm
F2PL0 4.702 ppm
F2L0 1881.22 Hz
F2PH1 3.415 ppm
F2H1 1366.61 Hz
F1PL0 4.700 ppm
F1L0 1880.75 Hz
F1PH1 3.414 ppm
F1H1 1366.14 Hz
F2NMCH 0.10/18 ppm/cm
F2H2CH 0.10/18 Hz/cm
F1NMCH 0.10/18 ppm/cm
F1H2CH 0.10/18 Hz/cm

PC66m3-3 tocsy

MMQC



Current Data Parameters
NAME 6P6m3-2
EXPNO 8
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 500000
Time 3.33
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinu
PULPROG invbortp
TD 512
SOLVENT D2O
NS 8
DS 16
SWH 4084.967 Hz
FIDRES 7.978452 Hz
AQ 0.0627188 sec
RG 256
DM 122.400 usec
DE 4.50 usec
TE 323.0 K
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
PLS 62.00 dB
D1 1.50000000 sec
SF01 400.1318611 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB
D13 0.00000300 sec
P1 6.70 usec
D2 0.00345000 sec
PL2 -5.00 dB
P2 13.40 usec
P4 23.80 usec
SF02 100.6185686 MHz
NUC2 13C
D7 0.48400000 sec
P3 11.90 usec
D0 0.00000300 sec
PL12 9.00 dB
DE 4.50 usec
CPOPRG2 garp
PCPD2 64.00 usec
IN0 0.00001570 sec

F1 - Acquisition parameters
ND0 4
TD 256
SF01 100.6186 MHz
FIDRES 62.201431 Hz
SW 158.257 ppm

F2 - Processing parameters
SI 512
SF 400.1299992 MHz
WDW 0SINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 512
NC2 TPPI
SF 100.6127607 MHz
WDW SINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0

2D NMR plot parameters
CX2 12.00 cm
CX1 12.00 cm
F2PL0 4.700 ppm
F2L0 1880.61 Hz
F2PH1 3.100 ppm
F2H1 1240.40 Hz
F4PL0 86.000 ppm
F4L0 8853.92 Hz
F4PH1 56.000 ppm
F4H1 5634.31 Hz
F0PPMCM 0.13333 ppm/cm
F2H2CM 53.35066 Hz/cm
F1PPMCM 2.66667 ppm/cm
F1H2CM 268.30069 Hz/cm

PC6m3-2 HMQC

HMRC.

Current Data Parameters
 NAME 6P66m3-2
 EXPNO 0
 PROCNO 1

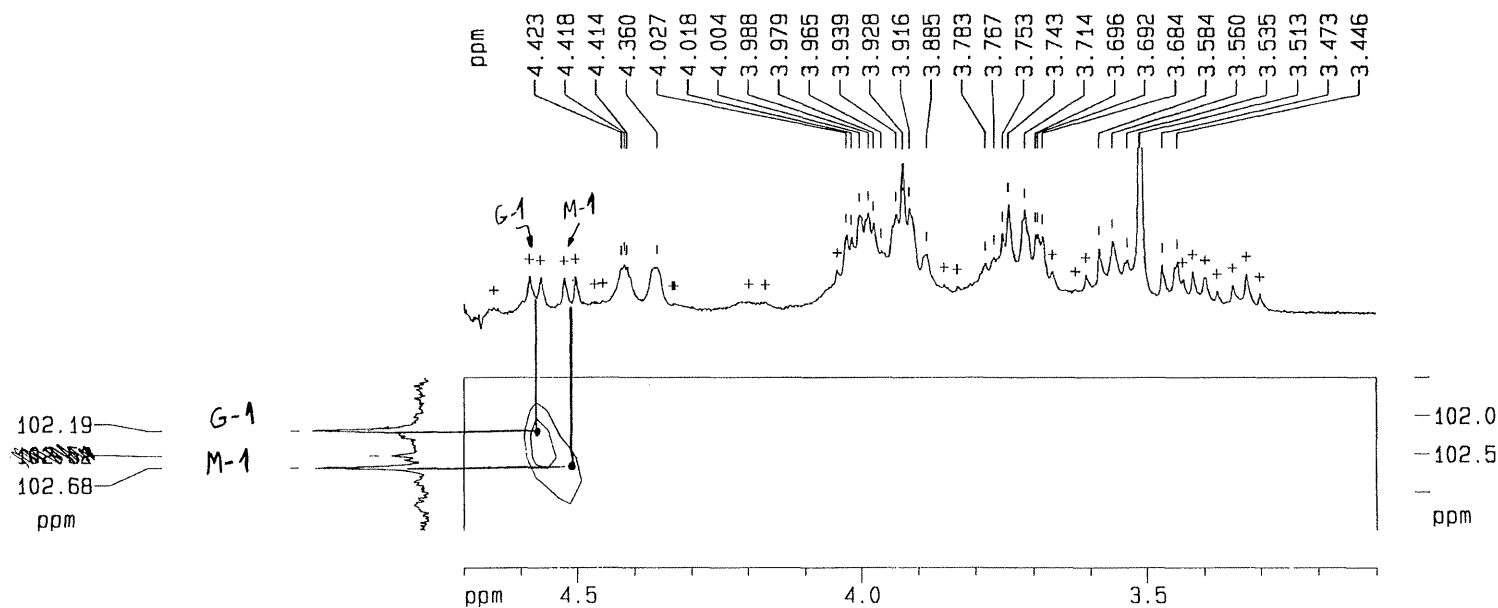
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 500000
 Time 3.33
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG invbptp
 TD 512
 SOLVENT D2O
 NS 8
 DS 16
 SWH 4084.967 Hz
 FIDRES 7.978452 Hz
 AQ 0.0627188 sec
 RG 256
 DW 122.400 usec
 DE 4.50 usec
 TE 323.0 K
 D11 0.03000000 sec
 D12 0.00020000 sec
 PL9 62.00 dB
 D1 1.50000000 sec
 SF01 400.1318811 MHz
 NUC1 1H
 PL1 -3.00 dB
 D13 0.00000300 sec
 P1 6.70 usec
 D2 0.00345000 sec
 PL2 -6.00 dB
 P2 13.40 usec
 P4 23.80 usec
 SF02 100.6185886 MHz
 NUC2 13C
 D7 0.48400000 sec
 P3 11.90 usec
 D0 0.00000300 sec
 PL12 9.00 dB
 DE 4.50 usec
 CPOPRG2 garp
 PCPO2 64.00 usec
 IN0 0.0001570 sec

F1 - Acquisition parameters
 NDO 4
 TD 256
 SF01 100.6186 MHz
 FIDRES 62.201431 Hz
 SW 159.257 ppm

F2 - Processing parameters
 S1 512
 SF 400.1299952 MHz
 WDM QSINE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

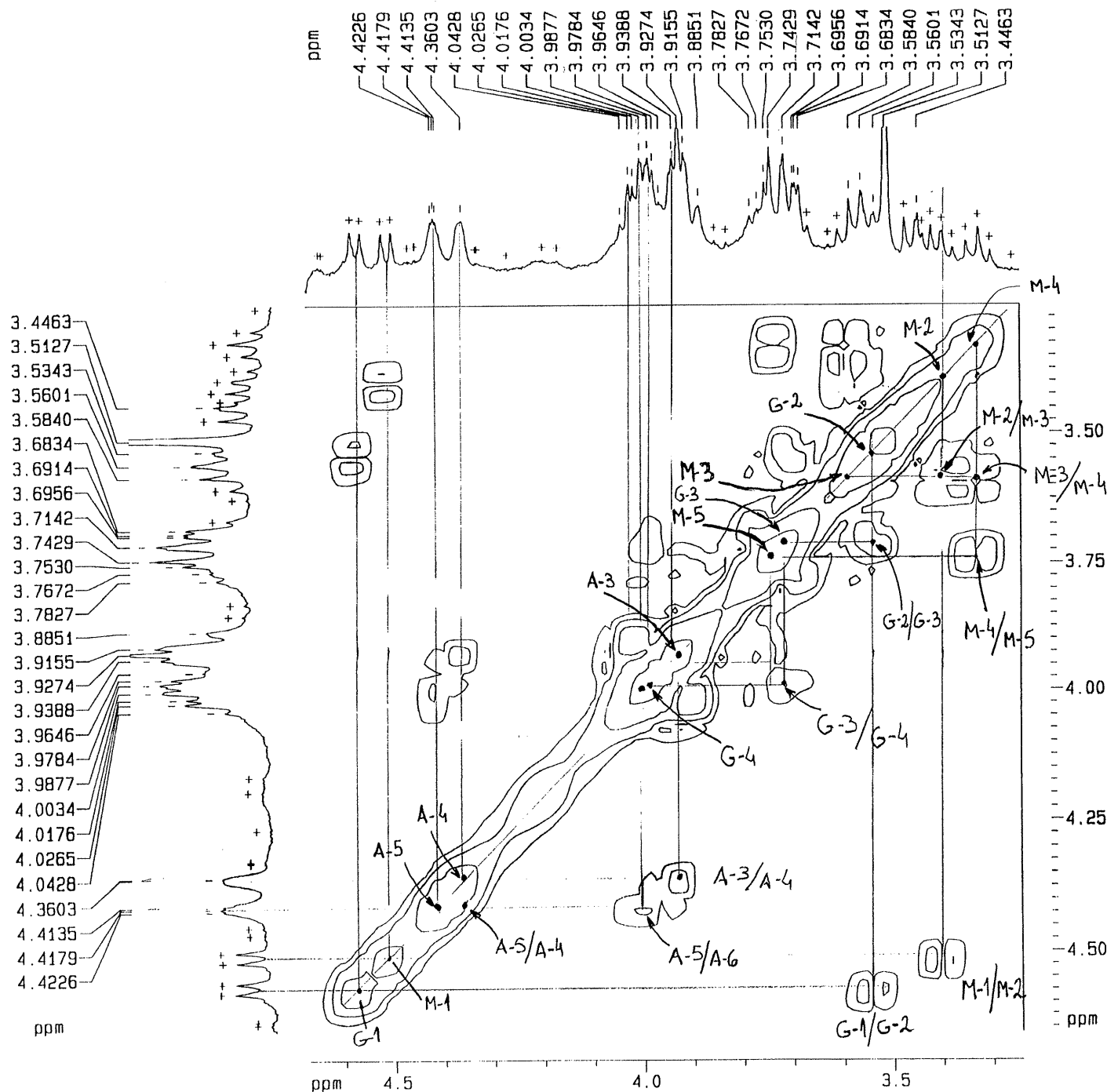
F1 - Processing parameters
 S1 512
 NC2 TPP1
 SF 100.6127607 MHz
 WDM SINE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0

2D NMR plot parameters
 CX2 12.00 cm
 CX1 2.00 cm
 F2PLO 4.700 ppm
 F2LO 1880.61 Hz
 F2PHI 3.100 ppm
 F2HI 1240.40 Hz
 F1PLO 103.500 ppm
 F1LO 10413.42 Hz
 F1PHI 101.500 ppm
 F1HI 10212.20 Hz
 F2PPMCM 0.13333 ppm/cm
 F2HZCM 53.35066 Hz/cm
 F1PPMCM 1.00000 ppm/cm
 F1HZCM 100.61276 Hz/cm



PC66m3-2 HMRC

cosy



Current Data Parameters
NAME 6P66m3-2
EXPNO 5
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 900000
Time 11.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinu
PULPROG cosypr
TD 512
SOLVENT D2O
NS 16
DS 32
SHH 4125.413 Hz
FIDRES 8.057446 Hz
AQ 0.0621044 sec
RG 4096
DW 121.200 usec
DE 4.50 usec
TE 300.0 K
D11 0.03000000 sec
D12 0.0002000 sec
PL9 62.00 dB
D1 2.00000000 sec
SF01 400.1318808 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB
D13 0.00000300 sec
P1 6.70 usec
D0 0.00000300 sec
P0 6.70 usec
DE 4.50 usec
IN0 0.00024240 sec

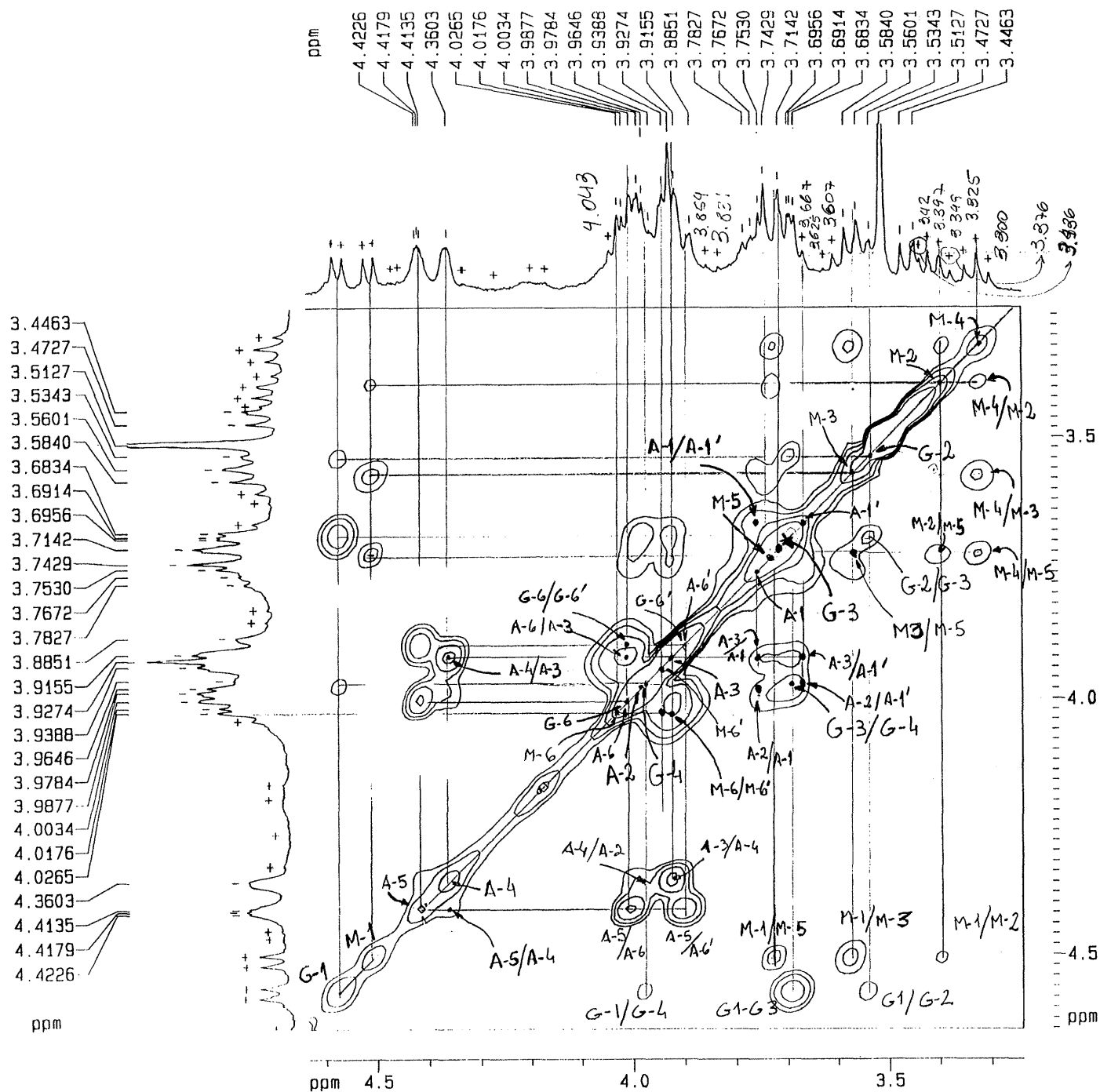
F1 - Acquisition parameters
NOO 1
TD 512
SF01 400.1319 MHz
FIDRES 8.057446 Hz
SH 10.310 ppm

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.1299912 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
NC2 0F
SF 400.1299918 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

2D NMR plot parameters
CX2 12.00 cm
CX1 12.00 cm
F2PLO 4.672 ppm
F2LO 1869.38 Hz
F2PHI 3.242 ppm
F2HI 1297.30 Hz
F1PLO 4.882 ppm
F1LO 1885.29 Hz
F1PHI 3.252 ppm
F1HI 1301.27 Hz
F2PPNCH 0.11914 ppm/cm
F2HZCM 47.67323 Hz/cm
F1PPNCH 0.11747 ppm/cm
F1HZCM 47.00177 Hz/cm

PC66m3-2 cosy



Current Data Parameters
NAME GP66m3-2
EXPNO 6
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 800000
Time 18 55
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinu
PULPROG nlevprtp
TD 512
SOLVENT D2O
NS 16
DS 16
SWH 4084.967 Hz
FIDRES 7.978452 Hz
AQ 0.0627188 sec
RG 8
DM 122.400 usec
DE 4.50 usec
TE 300.0 K
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
PL9 62.00 dB
D1 2.00000000 sec
SF01 400.1318608 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB
D13 0.00000300 sec
P1 6.70 usec
D0 0.00000300 sec
PL10 10.00 dB
P17 2500.00 usec
P6 38.10 usec
P7 75.20 usec
L1 28
P5 25.15 usec
DE 4.50 usec
IN0 0.00012240 sec

F1 - Acquisition parameters
N00 2
TD 512
SF01 400.1318 MHz
FIDRES 7.978452 Hz
SW 10.209 ppm

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.1299982 MHz
WDW SINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 TPPI
SF 400.1299982 MHz
WDW SINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0

2D NMR plot parameters
CX2 12.00 cm
CX1 12.00 cm
F2PLO 4.635 ppm
F2LO 1854.65 Hz
F2PHI 3.239 ppm
F2H1 1296.16 Hz
F1PLO 4.642 ppm
F1LO 1857.57 Hz
F1PHI 3.247 ppm
F1H1 1299.08 Hz
F2PPMCM 0.11631 ppm/cm
F2HZCM 46.54097 Hz/cm
F1PPMCM 0.11631 ppm/cm
F1HZCM 46.54097 Hz/cm

PC66m3-2 tacy