



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Polissacarídeos das Algas Marinhas *Gracilaria cornea* J. Agardh
e *Agardhiella ramosissima* (Harv.) Kylin: Estrutura e
Aplicações Biológicas**

Márcia Rúbia Silva Melo

Fortaleza – CE

2005

Márcia Rúbia Silva Melo

**Polissacarídeos das Algas Marinhas *Gracilaria cornea* J. Agardh
e *Agardhiella ramosissima* (Harv.) Kylin: Estrutura e
Aplicações Biológicas**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

FORTALEZA

Abril - 2005

M486p

Melo, Márcia Rúbia Silva
Polissacarídeos das algas marinhas *Gracilaria cornea*
J. Agardh e *Agardhiella ramosissima* (Harv.) Kylin: estrutura e
aplicações biológicas / Márcia Rúbia Silva Melo – 2005.
176 f.:

Tese (Doutorado) Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,
2005. Orientador(a) : Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Co-Orientadora: Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte

1. Alga vermelha 2. Polissacarídeo sulfatado 3. Atividade
anticoagulante I. Título

CDD 574.192

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Márcia Rúbia Silva Melo

TESE APROVADA EM: 20/04/2005.

Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Orientadora
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte
Co-orientadora
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Conselheiro
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Conselheira
Depto. de Química Orgânica e Inorgânica
Universidade Federal de Ceará

Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Conselheira
Depto. de Química Orgânica e Inorgânica
Universidade Federal de Ceará

**A DEUS, por sua presença em todas as
minhas realizações.**

CONSAGRO

**Ao meu filho CAIO e aos meus pais
MACÊDO e CLEIDE, por seus amores
incondicionais.**

**Ao meu namorado RODRIGO, por
saber me conquistar a cada dia.**

DEDICO

Ofereço aos amigos do coração

Durante os 4 anos de doutorado, tive a feliz oportunidade de conhecer diversos lugares e pessoas interessantes. Por vezes, no afã de aprender, deixei de ser experimentadora e me permiti ser experimentada pelas inúmeras situações vividas. Cada nova experiência a qual fui submetida, era uma fonte de conhecimentos que me preparava para mais outra etapa. Por várias vezes me senti cansada e sozinha. Por várias vezes senti saudades e quis voltar. Por incontáveis vezes apliquei meus conhecimentos, fui útil e me senti forte por isso. Foi aí que percebi que a grandeza de viver está em aprender e ensinar, interagir de forma construtiva com tudo e com todos, e principalmente que a vida, sem dúvidas, é um eterno aprendizado. Hoje tenho saudades dos lugares em que estive, e muito mais ainda de algumas pessoas especiais que contribuíram enormemente para meu crescimento científico e pessoal, pois deixaram em mim um pouco de suas lições. Sou eternamente grata a todas essas pessoas, e graças a elas, e a tudo o que aprendi, me sinto cada vez mais apta a novas experiências, sobretudo, a novos experimentos.

Gostaria de deixar aqui a letra de uma música de Gonzaguinha, que consegue de forma poética, expressar com carinho as lembranças vividas nas andanças da vida.

Caminhos do Coração (Pessoa = Pessoas)

*Há muito tempo que eu sai de casa, há muito tempo que eu cai na estrada,
Há muito tempo que eu estou na vida, foi assim que eu quis e assim eu sou feliz,
Principalmente por poder voltar a todos os lugares onde já cheguei,
Pois lá deixei um prato de comida, um abraço amigo, um canto pra dormir e sonhar,
E aprendi que se depende sempre de tanta muita diferente gente,
Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas,
E é tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá,
É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense estar,
É tão bonito quando a gente pisa firme nessas linhas que estão nas palmas de nossas mãos,
É tão bonito quando a gente vai a vida nos caminhos onde bate bem mais forte o coração.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Ana Lúcia Ponte Freitas, que acompanhou por mais de uma década a evolução gradativa de meu trabalho, dando-me preciosos conselhos, bem como apoio e estímulo constantes. Sou demasiadamente grata pelas inúmeras oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me foram disponíveis em seu laboratório.

À Profa. Maria Eugênia Rabello Duarte, pela valiosa orientação, receptividade e qualidade profissional. Sou igualmente grata ao Prof. Miguel Daniel Nosedá, que além de tudo, com sua espontaneidade, conquistou com facilidade o carinho de minha família.

À Profa. Judith Pessoa de Andrade Feitosa, pelas criteriosas sugestões, a qualquer tempo que lhe recorri, e em especial na versão final dessa tese. Obrigada pelos inestimáveis momentos em que me auxiliou e pelo exemplo de profissionalismo que tanto admiro.

À Profa. Regina Célia Monteiro de Paula, pela colaboração extremamente gentil, disponibilizando generosa atenção ao meu trabalho, em especial, aos espectros de RMN. Obrigada, principalmente, pela sua presença positiva no momento em que achei que não poderia mais continuar.

À Profa. Glauce Socorro de Barros Viana e ao amigo Dráulio Costa, pela orientação e auxílio nos ensaios de atividade antiplaquetária.

Ao Prof. Paulo Mourão, pela tranqüila recepção e acesso ao seu laboratório, bem como ao amigo Fábio Rabelo Melo e à Mariana Pereira, que favoreceram e auxiliaram nos ensaios de atividade anticoagulante.

À Dra. Rosângela Albuquerque Ribeiro, chefe do Laboratório de Coagulação do HEMOCE, e ao Marcos Antônio Martins da Silva, pela cordial colaboração nos ensaios de atividade anticoagulante.

À Profa. Sílvia Maria Pita Guimarães, do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo e à Norma Pinheiro Dantas, pesquisadora do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, pela classificação das algas. Em especial, gostaria de agradecer à Marisol Albano, bolsista do LABOMAR, pela grandiosa ajuda na feitura das exsiccatas.

À Profa. Fany Reicher e ao Prof. Renato de Azevedo Moreira, junto com minha orientadora, pela ocasião do PROCAD, que ampliou minhas perspectivas, aperfeiçoou meu

trabalho e me proporcionou momentos de crescimento. Muito obrigada pela confiança que me foi depositada.

À Profa. Maria Rita Sierakowski, que por tão bem conhecer química, sabe tornar prazeroso o seu aprendizado. Obrigada pela oportunidade que tive de testemunhar a sua competência profissional e o seu belíssimo lado humano.

Devo enorme gratidão a amigos e colegas cujo companheirismo, ajuda, estímulo e encorajamento, oferecidos das maneiras mais diversas, tiveram grande importância.

Dessa forma, gostaria de começar a agradecer pelo tamanho da saudade que sinto, a todos do Laboratório de Química de Carboidratos de Algas da UFPR: Paulinha, Juliana, Rosiane, Luciana, Flávia, Adriano, Alan, Marco, Sérgio, Diogo, Alexandre e Marcelo. Obrigada a cada um pelo cuidado, paciência, boa vontade e até mesmo pelos momentos de reserva que tanto conheci com os sulistas. Obrigada pelas vezes que tivemos de dividir bancadas, reagentes, pipetas, viais, horários nas estufas e nos computadores. Gostaria que soubessem que guardo com carinho as lembranças de todos, e que cada um, segundo a sua maneira, foi responsável por muitos acréscimos na minha vida. Sinto muita falta da célebre frase que nos permitia alforria: “Vamos à cantina?”. E das valiosas conversas que de lá surgiam.

Especialmente, agradeço a Paulinha (Paula Cristina de Sousa Faria), pela preciosa amizade que cultivamos até hoje. Pelos inúmeros auxílios, orientações e direcionamentos. Pelos vários momentos de descontração e apoio psicológico imprescindíveis. Na verdade, não tenho como agradecer, à altura da sua importância. Obrigada também ao César, por seu cuidado, respeito e amizade.

À Ju (Juliana Emanuela Fogari Cassolato) mil vezes obrigada por sua agradável e inestimável companhia. Pelos momentos de descontração e momentos de sufoco durante as disciplinas. Obrigada por sua cumplicidade diária, tanto nos experimentos, quanto na minha vida pessoal. Adoro você lindinha, muito obrigada por sua valiosa amizade!

À Rosi (Rosiane Guetter Mello Zibetti), que também acredito não ter, de forma justa, como agradecer toda a sua disposição, empenho e orientação. Obrigada pela sua amizade e, principalmente, pelo exemplo de profissionalismo que sempre demonstrou. Tenho certeza de que sabe que o pouco do que sei, devo muito a você. Obrigada por tudo.

Jamais poderia deixar de agradecer à Su (Suzana Ursi), pela neutralidade estrangeira que nos aproximou durante o período que estivemos em Curitiba. Obrigada pelo companheirismo, pelos passeios e principalmente por sua amizade.

Obrigada a todos do lab. da Profa. Fany Reicher, principalmente, à Andréia, pelas análises de GLC. A todos do lab. do Prof. Marcelo Iacomini, especialmente, ao Lauro e Eduardo, pelas análises de GLC-MS. A todos do lab. da Profa. Ma. Rita Sierakowski, pelo carinho que lhes tenho.

Minha estada em Curitiba não teria sido como foi se me faltasse a amizade calorosa de Ma. Abelha e sua família biológica, Ma. Cecília e Ma. Carolina, bem como sua extensão familiar enriquecida pelos pensionistas, Dani, outra Dani, Karla, Caio, Serginho e Jorginho. Obrigada pelo ambiente amistoso que sempre promoveu em seu pensionato. Sua presença materna e generosa hospitalidade fazem-me devedora de eterna gratidão.

Tenho muito a agradecer ao amigo Fábio Rabelo Melo, pela hospitalidade durante o período em que estive no Rio de Janeiro. Agradecimentos estendidos à Oscarina e Henrique, pela concessão da ocupação irregular da sala. Agradeço também a Celiana, que me acolheu emergencial e carinhosamente em seu kitnet, e à Catarina, último abrigo amigo do tão conturbado e proveitoso período no Rio.

Agradecimentos múltiplos a todos do Lab. de Polímeros da UFC, no qual aprendi a gostar mais de química e tenho, ao longo dos anos, acumulado muitas lições e amizades. Devo muito a todos, e sem suas valiosas colaborações, muito pouco teria sido o rendimento do meu trabalho. Agradeço individualmente à Durcilene, Leônia, Pablana e Jeanny pelos incontáveis auxílios e por todas as análises de IR, GPC e RMN.

Agradeço a todos do lab. do Prof. Renato de Azevedo Moreira, em especial à Turma do Sítio, liderada pelo magnífico Wagner, e em operação nas quintas “cruentas”, que tive o inenarrável prazer de participar, com personagens ecléticos e flutuantes, dentre eles: Glenda, Dani, Cláudia (sempre o quinto elemento), Álvaro e Kelton. Especialmente, agradeço a Dani (Daniele Teixeira) por sua amizade, companheirismo e descontração. Obrigada pelos momentos de valiosas discussões de resultados, e por dividir comigo muitas alegrias e limitações durante o período em que convivemos longe de nossas famílias.

Tenho muito a agradecer a todos do Lab. de Algas Marinhas 2: Profa. Norma Maria Barros Benevides, Maria, Márjory, Luana, Dayse, Rodrigo e Samuel, pelos auxílios

mútuos e por compartilhar da angústia oriunda das limitações de se trabalhar com polissacarídeos nesse departamento.

E a quem muito devo e admiro, Rodrigo César das Neves Amorim, por participar ativamente do meu dia a dia nesse último ano crucial. Por dividirmos momentos de alegria e frustração. Muito obrigada por sua cumplicidade e paciência. Alegro-me ao olhar para trás e perceber que juntos conseguimos superar vários momentos importantes. Hoje, tenho a maturidade para ver que tudo foi acréscimo e muito contribuiu para o enriquecimento da nossa história. Adoro muito você!

Agradeço de todo o meu coração a todos do Lab. de Algas Marinhas 1: Luiziete, Samya, Lídia, Juliana, Nilka, Thereza, Fábila, Bartolomeu, Dráulio, Dárlío, Luciano e Clark. Obrigada pelo convívio sempre agradável, pela cooperação, apoio e confiança. Obrigada por fazerem do lab. um lugar absolutamente favorável ao bem-estar de todos.

Obrigada Lu, por sua amizade de longa data e por todos os seus auxílios divinos, dentre eles, seu apoio incondicional na minha última viagem ao Rio. Você é maravilhosa, amiga! Samya, até mesmo pelas nossas diferenças! Lídia querida, por sua estimada amizade. Você é alguém muito especial que tenho grande admiração e carinho. Adoro você! Juliana, obrigada pela sua dedicação e, principalmente, pela nossa amizade. Você foi muito importante nesse último ano de trabalho. Desejo tudo de bom pra você! Nilka querida, nem precisa dizer do quanto é sua a responsabilidade de manter o bom-humor no lab. Obrigada pela sua alegria iluminada, força e atenção. Só uma pessoa sensível como você poderia ser tão extraordinária! Thereza, pela determinação própria de fazer parte dessa “família”. A sua presença e amizade sempre me foram muito agradáveis. E a você Fabinha, obrigada pela sua disposição e dedicação a todos que precisam no lab., seu interesse e boa vontade de aprender e ajudar é admirável, continue assim, você é muito competente! Obrigada Memeu, por seus incontáveis auxílios. Dráulio pela amizade e colaboração na atividade antiplaquetária. Dárlío especialmente pela oportunidade de participar do PROANTAR. Luciano e Clark pelo carinho e respeito que sinto, e principalmente por nossas amigadas conquistadas.

Agradeço também aos meus queridos amigos do LABOMAR: Kílvia, Cândida, Graça, Janisi, Aline, João, Alex, Antônio Carlos, Daniel, P.A. Ronaldo, Thales e Tito, que foram com certeza, as melhores companhias que tive em muitos momentos inesquecíveis.

Este trabalho foi realizado graças às seguintes Instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de convênio firmado entre os Cursos de Pós-Graduação em Bioquímica dos Departamentos de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará e Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. À Bolsa concedida e ao Programa PROCAD.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujo Laboratório de Algas Marinhas 1 foi executado parte deste trabalho.

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujo Laboratório de Polímeros foi executado parte deste trabalho.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, em cujo Laboratório de Química de Carboidratos de Algas foi executado parte deste trabalho.

Departamento de Bioquímica Médica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em cujo Laboratório de Tecido Conjuntivo foi realizada parte dos ensaios de atividade anticoagulante.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, em cujo Laboratório de Neurofarmacologia foram realizados os ensaios de agregação plaquetária.

Centro de Hematoterapia e Hematologia do Ceará (HEMOCE), em cujo Laboratório de Coagulação for realizada parte dos ensaios de atividade anticoagulante.

Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP), pelos convênios e auxílios concedidos junto ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos convênios, com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

SUMÁRIO RESUMIDO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xxi
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES.....	xxiii
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
Parte 1	29
Considerações Teóricas sobre Polissacarídeos de Algas Marinhas.....	29
1. Introdução.....	30
2. Objetivos.....	59
Parte 2	60
Estudos Químicos e Estruturais dos Polissacarídeos Sulfatados da Alga Marinha Vermelha <i>Gracilaria cornea</i>.....	60
3. Materiais e Métodos.....	61
4. Resultados e Discussão.....	73
Parte 3	114
Estudos Químicos e Estruturais dos Polissacarídeos Sulfatados da Alga Marinha Vermelha <i>Agardhiella ramosissima</i>.....	114
5. Materiais e Métodos.....	115
6. Resultados e Discussão.....	121
Parte 4	144
Aplicações Biológicas dos Polissacarídeos das Algas Marinhas <i>Gracilaria cornea</i> e <i>Agardhiella ramosissima</i>.....	144
7. Materiais e Métodos.....	145
8. Resultados e Discussão.....	149
Subparte	158
9. Conclusões.....	159
10. Referências Bibliográficas.....	160

SUMÁRIO DETALHADO

	PÁGINA
Parte 1	29
Considerações Teóricas sobre Polissacarídeos de Algas Marinhas.....	29
1. Introdução.....	30
1.1. MACROALGAS – CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	30
1.1.1. Polissacarídeos de reserva.....	32
1.1.2. Composição da parede celular.....	34
1.2. GALACTANAS SULFATADAS OBTIDAS DE ALGAS VERMELHAS.....	36
1.2.1. Galactanas do tipo agarana.....	38
1.2.2. Galactanas do tipo carragenana.....	42
1.2.3. Galactanas do tipo híbrido D/L.....	45
1.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS.....	47
1.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE COAGULAÇÃO.....	51
1.4.1. Ativação plaquetária.....	54
1.4.2. Drogas anticoagulantes, antitrombóticas e antiplaquetárias.....	56
2. Objetivos.....	59
Parte 2	60
Estudos Químicos e Estruturais dos Polissacarídeos Sulfatados da Alga Marinha Vermelha <i>Gracilaria cornea</i>.....	60
3. Materiais e Métodos.....	61
3.1. ALGA MARINHA – COLETA E PROCESSAMENTO.....	61
3.2. REAGENTES.....	62
3.3. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	62
3.4. FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. cornea</i> POR SOLUBILIZAÇÃO AQUOSA.....	64
3.5. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. cornea</i> POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.....	64

3.6.	MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	64
3.6.1.	Dosagem de sulfato.....	64
3.6.2.	Dosagem de proteína.....	65
3.6.3.	Dosagem de carboidrato.....	65
3.6.4.	Rotação óptica específica.....	65
3.7.	HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL.....	66
3.8.	HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL.....	66
3.9.	DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.....	67
3.9.1.	Preparo do sal de piridônio.....	67
3.9.2.	Solvólise.....	67
3.9.3.	Curva de dessulfatação.....	67
3.10.	TRATAMENTO ALCALINO.....	68
3.10.1.	Analítico.....	68
3.10.2.	Semi-preparativo.....	68
3.10.3.	Estudo cinético da reação de ciclização.....	68
3.11.	METILAÇÃO.....	69
3.11.1.	Preparo do sal de trietilamônio.....	69
3.11.2.	Metilação.....	69
3.12.	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	70
3.12.1.	Cromatografia líquida-gasosa (CLG).....	70
3.12.2.	Cromatografia líquida-gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CLG-EM).....	70
3.12.3.	Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	71
3.13.	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	71
3.13.1.	Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de ¹³ C).....	71
3.13.2.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	72
4.	Resultados e Discussão.....	73
4.1.	OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>Gracilaria cornea</i>	73

4.1.1.	Extração e análise química.....	73
4.1.2.	Composição monossacarídica.....	77
4.1.3.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho...	79
4.1.4.	Espectro de RMN de ¹³ C das frações brutas Gc1, Gc2 e Gc3.....	84
4.2.	PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Gracilaria cornea</i> POR SOLUBILIZAÇÃO AQUOSA.....	87
4.2.1.	Obtenção e análise química.....	87
4.2.2.	Composição monossacarídica.....	89
4.2.3.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.	90
4.2.4.	Determinação da massa molar.....	92
4.2.5.	Dessulfatação solvolítica (solvólise) das frações Gc2 e Gc2S.....	95
4.2.6.	Tratamento alcalino da fração Gc2S.....	97
	4.2.6.1. Estudos cinéticos da reação de ciclização.....	97
	4.2.6.2. Tratamento alcalino preparativo.....	99
4.2.7.	Análise de metilação das frações Gc2S e Gc2S-TA.....	104
4.3.	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO Gc2S POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.....	107
4.3.1.	Obtenção e análise química.....	107
4.3.2.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.	108
4.3.3.	Determinação da massa molar.....	110
	Parte 3	114
	Estudos Químicos e Estruturais dos Polissacarídeos Sulfatados da Alga Marinha Vermelha <i>Agardhiella ramosissima</i>.....	114
5.	Materiais e Métodos.....	115
5.1.	ALGA MARINHA – COLETA E PROCESSAMENTO.....	115
5.2.	REAGENTES.....	116
5.3.	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	116
5.4.	PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>A. ramosissima</i> POR SOLUBILIZAÇÃO AQUOSA.....	118

5.5.	PRECIPITAÇÃO FRACIONADA COM KCl.....	118
5.6.	MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	119
5.7.	HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL.....	119
5.8.	DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.....	119
5.9.	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	119
5.10.	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	120
6.	Resultados e Discussão.....	121
6.1.	OBTENÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA DE <i>Agardhiella ramosissima</i>	121
6.1.1.	Extração e rendimento.....	121
6.2.	PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO BRUTO DE <i>Agardhiella ramosissima</i> (ArB) POR SOLUBILIZAÇÃO AQUOSA.....	122
6.2.1.	Obtenção e análise química.....	122
6.2.2.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	125
6.2.3.	Determinação da massa molar.....	126
6.2.4.	Composição monossacarídica.....	127
6.2.5.	Dessulfatação solvolítica (solvólise) da fração ArS.....	129
6.3.	FRACIONAMENTO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO SOLÚVEL DE <i>Agardhiella ramosissima</i> (ArS) POR PRECIPITAÇÃO COM CLORETO DE POTÁSSIO (KCl).....	131
6.3.1.	Obtenção e análise química.....	131
6.3.2.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	135
6.3.3.	Espectro de RMN das subfrações ArK-b e ArK-c.....	138
6.3.4.	Determinação da massa molar.....	140
	Parte 4	144
	Aplicações Biológicas dos Polissacarídeos das Algas Marinhas <i>Gracilaria cornea</i> e <i>Agardhiella ramosissima</i>.....	144
7.	Materiais e Métodos	145

7.1.	ALGAS MARINHAS.....	145
7.2.	REAGENTES.....	145
7.3.	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE <i>Gracilaria cornea</i> e <i>Agardhiella</i> <i>ramosissima</i>	145
7.3.1.	“Pool” de plasma pobre em plaquetas.....	145
7.3.2.	Atividade anticoagulante pelo teste do Tempo de Ativação Parcial da Tromboplastina (APTT).....	146
7.3.3.	Atividade anticoagulante pelo teste do Tempo de Trombina (TT).....	146
7.4.	ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE <i>Gracilaria cornea</i> e <i>Agardhiella ramosissima</i> SOBRE A AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	147
7.4.1.	Colheita do sangue e obtenção do plasma.....	147
7.4.2.	Testes de agregação plaquetária.....	147
7.4.3.	Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP pelos polissacarídeos sulfatados solúveis obtidos de <i>Agardhiella</i> <i>ramosissima</i> (fração ArS) e <i>Gracilaria cornea</i> (Gc2S).....	148
8.	Resultados e Discussão	149
8.1.	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE.....	149
8.2.	INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP EM PRP.....	153
	Subparte	158
9.	Conclusões	159
10.	Referências Bibliográficas	160

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Esquema 3.1. Extração aquosa dos polissacarídeos da alga vermelha <i>Gracilaria cornea</i> a 25 °C e 100 °C.....	63
Esquema 4.1. Purificação dos polissacarídeos obtidos da alga <i>Gracilaria cornea</i> ...	87
Esquema 5.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados da alga vermelha <i>Agardhiella ramosissima</i> por hidrólise enzimática e precipitação com CPC.....	117
Esquema 6.1. Purificação dos polissacarídeos obtidos da alga <i>Agardhiella ramosissima</i>	122
1.1. Estrutura química dos florideosídeos, Isoflorideosídeos (formas D e L) e digeneasídeo, os carboidratos de baixa massa molecular presentes nas algas pertencentes à divisão Rhodophyta.....	33
1.2. Estrutura apresentada pelos poliálcoois D-manitol, D-sorbitol e dulcitol encontrados em diferentes grupos de algas vermelhas.....	33
1.3. Unidades repetitivas presentes nas galactanas de algas vermelhas.....	36
1.4. Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L-alternantes.....	39
1.5. Estruturas extremas encontradas em agaranas: Agarose (I); Precursor da Agarose (II).....	40
1.6. Estrutura básica das porfiranas.....	41
1.7. Estrutura básica repetitiva de carragenanas, com unidades D- alternantes.....	42
1.8. Unidades repetitivas presentes nas galactanas híbridas D/L com unidades B podendo ocorrer nas configurações D- e L-.....	45
1.9. Etapas do processo de formação do tampão hemostático.....	52
1.10. Cascata de coagulação sangüínea.....	53
1.11. Mecanismo de ativação plaquetária a partir do receptor glicoprotéico GPIIbIIIa.....	55
3.1. Fotografia da alga marinha vermelha <i>Gracilaria cornea</i> J. Agardh.....	61
4.1. Espectro na região de infravermelho da fração Gc1 em pastilha de KBr.....	81

4.2.	Espectro na região de infravermelho da fração Gc1rep em pastilha de KBr..	81
4.3.	Espectro na região de infravermelho da fração Gc2 em pastilha de KBr.....	82
4.4.	Espectro na região de infravermelho da fração Gc3 em pastilha de KBr.....	83
4.5.	Espectro na região de infravermelho da fração Gc4 em pastilha de KBr.....	83
4.6.	Espectro de RMN de ¹³ C da fração Gc1.....	84
4.7.	Espectro de RMN de ¹³ C da fração Gc2.....	85
4.8.	Espectro de RMN de ¹³ C da fração Gc3.....	85
4.9.	Espectro na região de infravermelho da fração Gc2S em pastilha de KBr.....	90
4.10.	Espectro na região de infravermelho da fração Gc3S em pastilha de KBr.....	91
4.11.	Espectro na região de infravermelho da fração Gc4S em pastilha de KBr.....	91
4.12.	Cromatograma de GPC da fração Gc1.....	92
4.13.	Cromatograma de GPC da fração Gc1rep.....	92
4.14.	Cromatograma de GPC da fração Gc2S.....	93
4.15.	Cromatograma de GPC da fração Gc3S.....	93
4.16.	Cromatograma de GPC da fração Gc4S.....	93
4.17.	Espectro de RMN de ¹³ C da fração Gc2S-D.....	96
4.18.	Curvas utilizadas para determinar a constante de velocidade (<i>k</i>) e o tempo de meia-vida (<i>t</i> _{1/2}) nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C.....	98
4.19.	Comparação dos espectros na região de infravermelho das frações Gc2S e Gc2S-TA em pastilha de KBr.....	101
4.20.	Espectro de RMN de ¹³ C da fração Gc2S.....	102
4.21.	Espectro de RMN de ¹³ C da fração Gc2S-TA.....	102
4.22.	Espectro na região de infravermelho da subfração Gc2S-w em pastilha de KBr.....	108
4.23.	Espectros na região de infravermelho das subfrações Gc2S-a, Gc2S-b e Gc2S-c em pastilha de KBr.....	109
4.24.	Cromatograma de GPC da subfração Gc2S-a.....	110
4.25.	Cromatograma de GPC da subfração Gc2S-b.....	110
4.2.6.	Cromatograma de GPC da subfração Gc2S-c.....	110
5.1.	Fotografia da alga marinha vermelha <i>Agardhiella ramosissima</i> (Harv.) Kylin.....	115

6.1.	Espectro na região do infravermelho da fração ArS em pastilha de KBr.....	125
6.2.	Cromatograma de GPC da fração solúvel ArS.....	126
6.3.	Espectro de RMN de ^{13}C da fração ArS.....	128
6.4.	Espectros na região de infravermelho das frações ArS e ArS-D, em pastilha de KBr.....	130
6.5.	Espectro na região de infravermelho da subfração ArK-a em pastilha de KBr.....	135
6.6.	Espectro na região de infravermelho da subfração ArK-b em pastilha de KBr.....	136
6.7.	Espectro na região de infravermelho da subfração ArK-c em pastilha de KBr.....	136
6.8.	Espectro na região de infravermelho da subfração ArK-d em pastilha de KBr.....	137
6.9.	Espectro de RMN de ^{13}C da subfração ArK-b.....	138
6.10.	Espectro de RMN de ^{13}C da subfração ArK-c.....	139
6.11.	Cromatograma de GPC da subfração ArK-b.....	140
6.12.	Cromatograma de GPC da subfração ArK-c.....	140
6.13.	Cromatograma de GPC da subfração ArK-d.....	140
8.1.	Teste de APTT das frações polissacarídicas da alga <i>Agardhiella ramosissima</i> , utilizando como padrão a Heparina.....	149
8.2.	Teste de TT dos polissacarídeos da alga <i>Agardhiella ramosissima</i> , utilizando como padrão a Trombina.....	152
8.3.	Ação inibitória da fração ArS na agregação de plaquetas induzidas por ADP.....	155
8.4.	Curva de relação dose-efeito da fração ArS em plaquetas ativadas por ADP	155

Principais unidades monossacarídicas presentes na galactana Gc2S.....	112
Unidades A.....	112
Unidades B.....	113
Principais unidades monossacarídicas presentes na galactana ArS.....	143
Unidades A.....	143
Unidades B.....	143

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1.1. Resumo comparativo de algumas características dos Filos Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta.....	31
1.2. Notações de unidades de açúcares e grupos substituintes de agaranas e carragenanas.....	37
1.3. Classificação das carragenanas de acordo com a substituição das unidades.....	43
4.1. Rendimento e análise química das frações polissacarídicas de <i>Gracilaria cornea</i> , após extração aquosa nas temperaturas de 25 e 100 °C.....	74
4.2. Rendimentos de ágar de espécies de <i>Gracilaria</i>	75
4.3. Composição monossacarídica das frações da alga vermelha <i>Gracilaria cornea</i>	77
4.4. Atribuições no espectro de infravermelho para polissacarídeos de algas....	80
4.5. Rendimento e análise das frações de <i>Gracilaria cornea</i> , obtidas após fracionamento e solubilização aquosa.....	88
4.6. Comparação entre a composição monossacarídica da fração Gc2 e Gc2S de <i>Gracilaria cornea</i>	89
4.7. Massas molares para cada pico das frações de polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria cornea</i>	94
4.8. Curva de dessulfatação solvolítica da fração Gc2.....	95
4.9. Reação de ciclização da fração Gc2S em NaOH, a diferentes temperaturas.....	97
4.10. Rendimento e análise química das frações Gc2S e Gc2S-TA.....	99
4.11. Composição monossacarídica das frações Gc2S e Gc2S-TA.....	100
4.12. Análises de metilação das frações Gc2S e Gc2S-TA.....	105
4.13. Rendimento e análise química das subfrações obtidas após cromatografia de troca-iônica da fração Gc2S.....	107
4.14. Massas molares para cada pico das subfrações de polissacarídeos obtidos por DEAE-Sephacel.....	111

6.1.	Rendimento, análise química e rotação óptica da fração ArS de <i>Agardhiella ramosissima</i>	123
6.2.	Composição monossacarídica da fração ArS da alga <i>A. ramosissima</i>	127
6.3.	Assinalamentos químicos de RMN de ¹³ C para a fração ArS.....	119
6.4.	Rendimento das subfrações de ArS obtidas após fracionamento com KCl.	132
6.5.	Análise química, rotação óptica e composição monossacarídica das subfrações de ArS obtidas após fracionamento com KCl.....	133
6.6.	Assinalamentos químicos de RMN de ¹³ C para ArK-b e ArK-c.....	139
6.7.	Massas molares para cada pico das subfrações de polissacarídeos obtidos por fracionamento com cloreto de potássio.....	141
8.1.	Atividade anticoagulante pelo teste de APTT das frações de <i>A. ramosissima</i>	150
8.2.	Atividade anticoagulante pelo teste de APTT das frações de <i>G. cornea</i>	151
8.3.	Ação inibitória do polissacarídeo sulfatado solúvel obtido de <i>A. ramosissima</i> (ArS) na agregação plaquetária induzida por ADP.....	154
8.4.	Ação inibitória do polissacarídeo sulfatado solúvel obtido de <i>G. cornea</i> (Gc2S) na agregação plaquetária induzida por ADP.....	156

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ADP	Adenosina difosfato
ArB	Fração bruta de polissacarídeo da alga <i>Agardhiella ramosissima</i>
ArK-a	Fração precipitada com cloreto de potássio 0,3-0,4 M
ArK-b	Fração precipitada com cloreto de potássio 0,8-1,0 M
ArK-c	Fração precipitada com cloreto de potássio 1,0-1,5 M
ArK-d	Fração solúvel em cloreto de potássio 2 M
ArS	Fração solúvel de polissacarídeo da alga <i>Gracilaria cornea</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CLG	Cromatografia líquida-gasosa
CLG-EM	Cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa
CPC	Cloreto de cetilpiridínio (Cetylpyridinium chloride)
DEAE-	
Sephacel	Dietilaminoetil-Sephacel
D ₂ O	Água deuterada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtOH	Etanol
FT-IR	Transformada de Fourier – Infravermelho (Fourier Transformed – Infrared)
Gc1	Fração obtida da 1ª extração aquosa a temperatura de 25 °C
Gc1rep	Fração obtida da 1ª extração aquosa a temperatura de 25 °C, reprecipitada com etanol.
Gc2	Fração obtida da 1ª extração aquosa a temperatura de 100 °C
Gc2-D	Fração dessulfatada proveniente da fração Gc2
Gc2S	Fração solúvel em água proveniente da fração Gc2
Gc2S-D	Fração dessulfatada proveniente da fração Gc2S
Gc2S-TA	Fração solúvel proveniente da fração Gc2, submetida ao tratamento alcalino
Gc2S-w	Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com água, a partir da fração Gc2S

Gc2S-a	Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com 0,25 M de NaCl, a partir da fração Gc2S
Gc2S-b	Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com 0,5 M de NaCl, a partir da fração Gc2S
Gc2S-c	Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com 0,75 M de NaCl, a partir da fração Gc2S
Gc3	Fração obtida da 2 ^a extração aquosa a temperatura de 100 °C
Gc3S	Fração solúvel em água proveniente da fração Gc3
Gc4	Fração obtida da 3 ^a extração aquosa a temperatura de 100 °C
Gc4S	Fração solúvel em água proveniente da fração Gc4
GPC	Cromatografia de permeação em gel
ICH ₃	Iodo-Metano
kDa	Kilodaltons
NaBH ₄	Boroidreto de sódio
ppm	Partes por milhão
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoroacético
[α] _D	Rotação óptica específica

RESUMO

A alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*, submetida à extração aquosa de seus polissacarídeos, apresentou um rendimento de 1,4 % na extração a frio, obtendo-se a fração Gc-1, e 26,2, 18,8 e 10,5 % nas três subseqüentes extrações a quente, originando as frações Gc2, Gc3 e Gc4, respectivamente. Os teores de sulfato nas frações variaram de 17,2 a 7,8 %. A fração Gc2 (de maior rendimento) foi submetida à solubilização em água, originando a fração Gc2S, composta principalmente por galactose (57,2 mol %), 3,6-anidrogactose (30,5 mol %), 6-*O*-metilgalactose (7,0 mol %), traços de xilose (3,3 mol %) e de glucose (1,0 mol %). A fração Gc2S apresentou rotação óptica negativa (-21,0 °), indicando tratar-se de uma agarana. A fração Gc2S foi submetida ao tratamento alcalino, originando a fração Gc2S-TA, que por espectro de RMN ¹³C, apresentou maior regularidade na cadeia, com um aumento no teor de 3,6-anidrogactose, confirmado pelos dados de composição monossacarídica. Os dados de metilação indicaram que as unidades A da fração Gc2S são representadas majoritariamente por β-D-galactopiranosose, possuindo baixas porcentagens dessa unidade naturalmente metilada em C-6 (6-*O*-metil-β-D-galactopiranosose) e ainda unidades de β-D-galactopiranosose 6-*O*-substituídas por unidades simples de xilose ou grupos *O*-sulfato. Suas unidades B são representadas majoritariamente por 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose, possuindo também 13 a 16 % de unidades precursoras (α-L-galactopiranosose-6-sulfato). A fração Gc2S apresenta ainda parte de suas unidades B não substituídas (α-L-galactopiranosose). A presença do derivado metilado 2,6-Gal indicou a existência de unidades A e B substituídas por unidades simples de xilose e/ou grupos *O*-sulfato em C-4 e C-3, respectivamente. Pelas análises de GPC a fração Gc2S apresentou-se polidispersa, com massa molar do seu principal pico de $4,4 \times 10^5$ g/mol. Para purificação dos polissacarídeos, a fração Gc2S foi submetida à cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel), e foi utilizado como eluente: água, e soluções de NaCl nas concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75 M, com rendimentos de 11,9, 18,2 e 21,3 %, respectivamente. As subfrações eluídas com gradiente salino crescente foram denominadas de Gc2S-a, Gc2S-b e Gc2S-c e apresentaram respectivos teores de sulfato de 10,6, 12,9 e 14,8 %. A subfração Gc2S-b homogênea por GPC apresentou massa molar de $3,5 \times 10^5$ g/mol. Talvez pelos

baixos teores de sulfato, a fração Gc2S não apresentou inibição da agregação plaquetária, tão pouco atividade anticoagulante.

A alga marinha vermelha *Agardhiella ramosissima* foi submetida à extração pela precipitação de seus polissacarídeos com CPC, com rendimento de 15,6 % do peso seco da alga, originando a fração bruta ArB. A fração ArS oriunda da fração bruta submetida a solubilização aquosa, com 66,2 % de rendimento, apresentou na composição monossacarídica contaminação com 26,4 mol% de glucose, e por análise de GPC se mostrou bastante polidispersa, com massa molar de seu pico majoritário de $7,4 \times 10^5$ g/mol. Dessa forma, a fração foi submetida à precipitação dos polissacarídeos com concentrações diferentes de KCl, rendendo as subfrações ArK-a (com 27,6 % de rendimento), ArK-b (55,0 %), ArK-c (7,5 %) e ArK-d (9,9 %). A subfração ArK-c apresentou-se rica em glucose (80,2 mol %), enquanto que as demais subfrações apresentaram-se ricas em galactose (57,6 – 74,4 mol %) e 3,6-anidrogactose (17,6 – 38,2 mol %), e com altos teores de sulfato (23,2 – 32,5 %). As subfrações ArK-b e ArK-c apresentaram rotação óptica positiva (+ 23 ° e + 19 °, respectivamente) indicando serem galactanas do tipo carragenana. A subfração ArK-d apresentou rotação óptica negativa (-12 °) indicando ser uma agarana ou híbrido D/L. Os espectros de RMN de ^{13}C das subfrações ArK-b e ArK-c apresentaram sinais na região anomérica atribuídos a unidades de β -D-galactopiranosose-4-sulfato (102,8 e 102,9 ppm, respectivamente) e de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato (92,7 e 92,8 ppm, respectivamente) sendo essa díade representativa da estrutura da iota-carragenana. Por análise de GPC as subfrações ainda apresentaram polidispersão, com massas molares dos principais picos de $3,7 \times 10^4$, $6,8 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^5$ g/mol, para ArK-b, ArK-c e ArK-d, respectivamente. Pelo grau de sulfatação acima de 20 %, a fração ArS apresentou inibição da agregação plaquetária e atividade anticoagulante. As subfrações ArK-c e ArK-d também apresentaram atividade anticoagulante, enquanto que a subfração ArK-b, provavelmente devido a sua baixa massa molar, não apresentou atividade anticoagulante.

ABSTRACT

The red seaweed *Gracilaria cornea*, submitted to the aqueous extraction of your polysaccharides, it presented a yield of 1,4 % in the extraction to cold, being obtained the fraction Gc-1, and 26,2, 18,8 and 10,5% in the three subsequent extractions the hot, originating the fractions Gc2, Gc3 and Gc4, respectively. The sulfate content in the fractions varied from 17,2 to 7,8 %. The fraction Gc2 (of larger yield) it was submitted to the solubilization in water, originating the fraction Gc2S, composed mainly by galactose (57,2 mol %), 3,6-anhydrogalactose (30,5 mol %), 6-*O*-methylgalactose (7,0 mol %), xylose (3,3 mol %) and glucose (1,0 mol %). The fraction Gc2S presented negative optical rotation (-21,0 °), indicating to treat of an agaran. The fraction Gc2S was submitted to the alkali treatment, originating the fraction Gc2S-TA, that for spectrum of ¹³C RMN, it presented larger regularity in the chain, with an increase in the content of 3,6-anhydrogalactose, confirmed by the data of monosaccharide composition. The analysis methylation indicated that the A-units of the fraction Gc2S are represented for the most part by β-D-galactopyranose, possessing low percentages of that unit naturally methyled in C-6 (6-*O*-methyl-β-D-galactopyranose) and units of β-D-galactopyranose still 6-*O*-substituted by simple units of xylose or groups *O*-sulfate. Your B-units are represented for the most part by 3,6-anhydro-α-L-galactopyranose, also possessing 13 to 16 % of precursory units (α-L-galactopyranose-6-sulfate). The fraction Gc2S still presents part of your B-units not substituted (α-L-galactopyranose). The presence of the derived methyled 2,6-Gal indicated the existence of A- and B-units substituted by simple units of xylose and/or groups *O*-sulfate in C-4 and C-3, respectively. For the analysis of GPC the fraction Gc2S behaves as a heterogeneous system, with molar mass of your principal peak of 4,4 x 10⁵ g/mol. To purification of the polysaccharides, the fraction Gc2S was submitted to anion-exchange chromatography (DEAE-Sephacel), and it was used as eluente: water, and solutions of NaCl in the concentrations of 0,25, 0,5 and 0,75 M, with yields of 11,9, 18,2 and 21,3%, respectively. The subfractions eluided with growing saline gradient were denominated of Gc2S-a, Gc2S-b and Gc2S-c and they presented respective content of sulfate of 10,6, 12,9 and 14,8 %. The subfraction homogeneous Gc2S-b for GPC presented molar mass of 3,5 x

10^5 g/mol. Perhaps for the low sulfate content, the fraction Gc2S didn't present inhibition of the platelet aggregation, such little anticoagulant activity.

The red seaweed *Agardhiella ramosissima* was submitted to the extraction by the precipitation of your polysaccharides with CPC, with yield of 15,6 % of the dry weight of the alga, originating the crude fraction ArB. The fraction ArS originating from of the submitted crude fraction the aqueous solubilization, with 66,2 % of yield, presented in the monosaccharide composition contaminates with 26,4 mol% of glucose, and for analysis of GPC behaves as a heterogeneous system, with molar mass of your majority peak of $7,4 \times 10^5$ g/mol. In that way, the fraction was submitted to the precipitation of the polysaccharides with concentrations different from KCl, surrendering the subfractions ArK-a (with 27,6 % of yield), ArK-b (55,0 %), ArK-c (7,5 %) and ArK-d (9,9 %). The subfraction ArK-c came rich in glucose (80,2 mol %), while the other subfractions came rich in galactose (57,6 - 74,4 mol %) and 3,6-anhydrogalactose (17,6 - 38,2 mol %), and with high sulfate content (23,2 - 32,5%). The subfractions ArK-b and ArK-c presented positive optical rotation (+ 23 ° and + 19 °, respectively) indicating be galactans of the type carragenan. The subfraction ArK-d presented negative optical rotation (-12 °) indicating to be an agaran or hybrid D/L. The spectra of ^{13}C RMN of the subfractions ArK-b and ArK-c presented signs in the anomeric zone attributed to units of β -D-galactopyranose-4-sulfate (102,8 and 102,9 ppm, respectively) and of 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose-2-sulfate (92,7 and 92,8 ppm, respectively) being that representative diad of the structure of the iota-carragenan. For analysis of GPC the subfractions still presented heterogeneous system, with molar masses of the principal peaks of $3,7 \times 10^4$, $6,8 \times 10^5$ and $1,5 \times 10^5$ g/mol, for ArK-b, ArK-c and ArK-d, respectively. For the sulfatation degree above 20%, the fraction ArS presented inhibition of the platelet aggregation and anticoagulant activity. The subfractions ArK-c and ArK-d also presented anticoagulant activity, while the subfração ArK-b, probably due to your low mass molar, it didn't present anticoagulant activity.

Parte 1

Considerações Teóricas sobre Polissacarídeos de Algas Marinhas

Sumário

1. Introdução
2. Objetivos

1.1. MACROALGAS – CARACTERÍSTICAS GERAIS

A constituição heterogênea dos organismos que compõe o grupo das algas, com indivíduos variando de uni a pluricelulares, autótrofos e heterótrofos, eucariontes e procariontes (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004), fez das premissas de classificar as algas em um só Reino, uma tarefa bastante difícil.

Contudo, e de uma maneira genérica, os indivíduos desse grupo tão diversificado possuem a capacidade de ocupar todos os meios, desde que lhes ofereçam luz e umidade suficiente para retirarem os nutrientes necessários a sua sobrevivência, com uma básica classificação de organismos fundamentalmente aquáticos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Como resultado perante a esse impasse, a classificação mais bem aceita posiciona todas as algas no reino Protista (LEE, 1989; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Em macrófitas (algas pluricelulares, eucariontes e autótrofas), as denominações em divisões geralmente referem-se à cor apresentada por esses organismos. De acordo com os pigmentos fotossintetizantes presentes, as macroalgas são divididas em: Rhodophyta, algas vermelhas; Phaeophyta, algas pardas e Chlorophyta, algas verdes (LEE, 1989). A natureza química dos produtos estocados e das paredes celulares também desempenha importante papel na definição desses vários grupos algais (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995). Similaridades e diferenças entre os grupos protistas acima citados estão sumarizadas na TABELA 1.1.

Como adaptações aos diferentes ambientes, as macroalgas podem se fixar a rochas ou substratos rochosos, calcários, sobre conchas de moluscos e ainda sobre outras algas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995). São mais abundantes em regiões quentes, próximas ao equador, onde apresentam tamanho reduzido e maior variabilidade de espécie, mas se estendem até águas mais frias, atingindo maiores proporções, com menor variabilidade de espécie. Nas regiões polares e sub-polares as divisões Phaeophyta e Chlorophyta são geralmente as mais abundantes (LEE, 1989; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

TABELA 1.1. Resumo comparativo de algumas características dos Filos Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta^a.

Filo	Número de Espécies	Pigmentos Fotossintetizantes	Produtos de Reserva (Carboidrato)	Componente da Parede Celular	Hábitat
Rhodophyta (algas vermelhas)	4.000-6.000	Clorofila <i>a</i> ; ficobilinas; carotenóides	Amido das florídeas	Microfibrilas de celulose imersas em uma matriz (geralmente galactanas); depósitos de carbonato de cálcio em muitas espécies	Predominantemente marinhas, aproximadamente 100 espécies de água doce; muitas espécies tropicais
Phaeophyta (algas pardas)	1.500	Clorofilas <i>a</i> e <i>c</i> ; carotenóides, principalmente fucoxantina	Laminarana, manitol	Celulose embebida em matriz mucilaginosa de alginato	Predominantemente marinhas; abundantes em águas oceânicas frias das regiões temperadas e polares
Chlorophyta (algas verdes)	17.000	Clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> ; carotenóides	Amido	Glicoproteínas, polissacarídeos não-celulósicos ou celulose	Maioria aquática, de água doce ou marinha; muitas apresentando relações simbióticas

^a = RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001.

Melo, M.R.S. (2005)

1.1.1. Polissacarídeos de reserva

Os principais produtos de reserva das algas vermelhas são os grânulos de amido das florídeas. Armazenados no citoplasma, o amido das florídeas é uma molécula que se assemelha à porção amilopectina do amido (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), pois é constituído por α -D-glucose, com ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ e ramificações no carbono 6 (PAINTER, 1983).

Carboidratos de baixa massa molecular (florideosídeo, isoflorideosídeo, digeneasídeo) e polióis (sorbitol e dulcitol), correlacionados com funções osmoregulatórias também são sintetizados pelas rodófitas (KARSTEN et al., 1999). Florideosídeo [*O*- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-glicerol] é o principal produto fotossintético das algas pertencentes às ordens Bangiales, Nemaliales, Gigartinales e Rhodymeniales, enquanto que o polissacarídeo ácido digeneasídeo [*O*- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-glicerato] é o principal produto fotossintético da ordem Ceramiales (LEE, 1989 – FIGURA 1.1).

Nas algas pardas, o principal carboidrato de reserva é denominado laminarana, uma glucana com ligações $\beta(1\rightarrow3)$ que se encontra armazenada em vacúolos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). As algas pardas também biossintetizam o manitol, um poliol de baixa massa molecular, que além de reserva, também está envolvido em funções de osmoregulação (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

O amido, principal carboidrato de reserva das algas verdes, é formado nos cloroplastos e é similar ao amido sintetizado pelos vegetais superiores na sua composição de amilose e amilopectina (LEE, 1989). Além do amido, as algas verdes também biossintetizam a sacarose, como o carboidrato de baixa massa molecular (KARSTEN et al., 1999).

Tais carboidratos de baixa massa molecular (CBMM) e os polióis com atividade osmorreguladora funcionam 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., 1999).

Os polióis são formados a partir de unidades monossacarídicas reduzidas, constituindo dessa maneira poliálcoois de D-manose, D-glucose e D-galactose (D-manitol, D-sorbitol e dulcitol, respectivamente - FIGURA 1.2), 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).

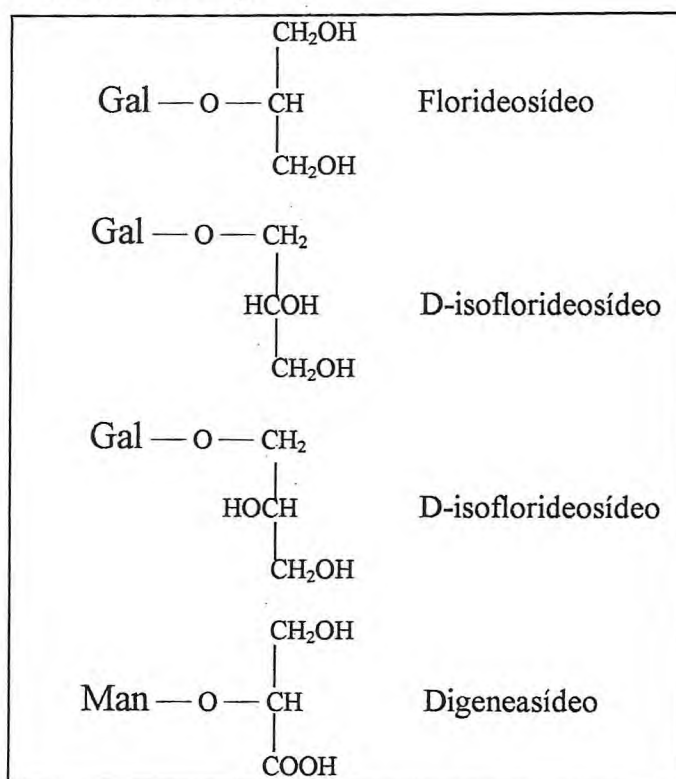


FIGURA 1.1. Estrutura química dos florideosídeos, Isoflorideosídeos (formas D e L) e digeneasídeo, os carboidratos de baixa massa molecular presentes nas algas pertencentes à divisão Rhodophyta. Gal = galactose e Man = manose.

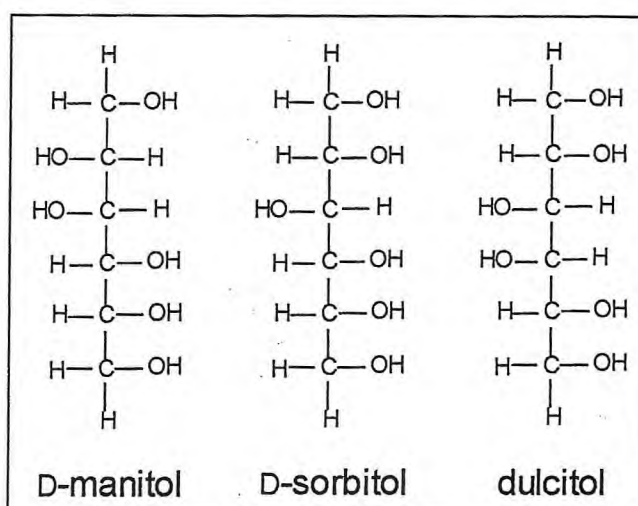


FIGURA 1.2. Estrutura apresentada pelos poliálcoois D-manitol, D-sorbitol e dulcitol encontrados em diferentes grupos de algas vermelhas.

1.1.2. Composição da parede celular

Como ainda observado na TABELA 1.1, as três divisões de macroalgas apresentam em suas paredes celulares, celulose (com algumas exceções) como constituinte principal da fração fibrilar, as quais conferem força e resistência à parede celular dessas algas. Nos gêneros *Porphyra* e *Bangia*, a parte fibrilar da parede celular consiste de uma xilana com ligações $\beta(1\rightarrow3)$, e mananas com ligações $\beta(1\rightarrow4)$ também ocorrem nesses gêneros de Rhodophyta (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

Exceções na divisão Chlorophyta também são relatadas. As ordens Tetraselmidales e Volvocales possuem suas paredes celulares compostas por glicoproteínas, enquanto que na ordem Caulerpales, xilanas e mananas geralmente substituem a celulose (LEE, 1989).

A fração fibrilar formadora do esqueleto da parede se encontra embebida numa matriz amorfa, constituída por um material mucilaginoso, responsável pela flexibilidade e a textura das macroalgas. Segundo Raven, Evert e Eichhorn (2001), a produção contínua e a renovação da mucilagem auxiliam as algas vermelhas a desfazer-se de outros organismos que poderiam colonizar suas superfícies e reduzir sua exposição à luz solar. Além disso, os polissacarídeos constituintes dessa matriz mucilaginosa também estão correlacionados com a regulação mecânica, osmótica e iônica, adaptando as algas ao ambiente marinho (KLOAREG; QUATRANO, 1988).

Os componentes mucilaginosos amorfos variam de acordo com as divisões das algas. O ácido alginico e as fucanas estão presentes nos espaços intercelulares e nas paredes celulares das algas pardas. As algas vermelhas possuem galactanas (ágar, carragenana, porfirana) como principais componentes da matriz amorfa. Nas algas verdes estes componentes são mais complexos e contêm resíduos de D-galactose, D-xilose, D-ácido glucorônico, L-arabinose e L-ramnose (PAINTER, 1983).

Uma característica peculiar as macroalgas, é a presença de pelo menos um polissacarídeo contendo éster sulfato em sua matriz mucilaginosa. Polissacarídeos sulfatados ainda não foram relatados em plantas superiores terrestres, embora eles ocorram amplamente no tecido conjuntivo dos invertebrados e em menor quantidade nos invertebrados (FARIAS et al., 2000).

Nas algas vermelhas os polissacarídeos sulfatados são encontrados na forma de galactanas sulfatadas, as quais são constituídas por unidades dissacarídicas repetitivas, da mesma forma que muitos polissacarídeos de tecido conjuntivo de animais, tais como: condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato e queratam sulfato (FARIAS, 2000; USOV, 1998).

Nas algas pardas os polissacarídeos sulfatados são encontrados na forma de fucanas sulfatadas, também denominadas de fucoidanas (BILAN et al., 2004). As fucoidanas obtidas das algas *Fucus distichus*, *Ascophyllum nodosum* e *Chorda filum* são constituídas somente por L-fucose (BILAN et al., 2004; MARAIS; JOSELEAU, 2001; CHIZHOV et al., 1999). A alga parda *Sargassum stenophyllum* biossintetiza dois tipos diferentes de fucoidanas. Uma delas é caracterizada por altas porcentagens de ácido glucurônico e baixo conteúdo de sulfato, sendo constituída principalmente por α -L-fucose. A outra fucoidana obtida contém baixas quantidades de α -D-ácido glucurônico e altas porcentagens de sulfato, e é constituída principalmente por fucose e galactose (DUARTE et al., 2001a).

As glucuronoramnoxiloglicanas sulfatadas, referidas simplesmente por ulvanas, são obtidas das algas verdes do gênero *Ulva* (LAHAYE; RAY, 1996). A alga verde *Cladophora socialis* biossintetiza um heteropolissacarídeo sulfatado, constituído principalmente por galactose, arabinose e xilose (RAMANA; RAO, 1991). Diferentes dos gêneros *Ulva* e *Cladophora*, os polissacarídeos sulfatados obtidos da alga verde *Codium cylindricum* são constituídos principalmente por galactose e glucose (MATSUBARA et al., 2001) enquanto que os obtidos da alga *Codium dwarkense* são constituídos majoritariamente por arabinanas sulfatadas e arabinogalactanas sulfatadas (SIDDHANTA et al., 1999).

1.2. GALACTANAS SULFATADAS OBTIDAS DE ALGAS VERMELHAS

As algas vermelhas biossintetizam uma grande variedade de galactanas sulfatadas que são os principais componentes da matrix intercelular. Essencialmente, elas consistem de cadeias lineares constituídas por dissacarídeos repetitivos, designados por unidade A, formada por unidades de β -D-galactopiranosose ligadas através dos carbonos C-1 e C-3, e unidade B formada por unidades de α -galactopiranosose, ligadas através dos carbonos C-1 e C-4. Algumas das unidades α -galactopiranosose podem também ocorrer na forma ciclizada 3,6-anidrogalactopiranosose (PAINTER, 1983). Logo, a cadeia linear da galactana é formada pela alternância das unidades A e B $(AB)_n$ de acordo com a estrutura repetitiva esquematizada na FIGURA 1.3.

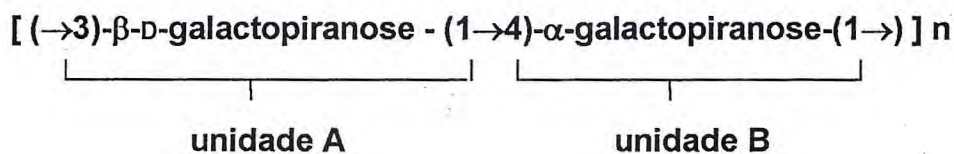


FIGURA 1.3. Unidades repetitivas presentes nas galactanas de algas vermelhas.

Dois grandes grupos de galactanas bem conhecidos são designados de agaranas e carragenanas. Eles diferem na configuração enantiométrica da unidade de α -galactose (unidade B), o qual é L para agaranas e D em carragenanas. Entretanto, a unidade de β -galactose (unidade A) sempre pertence à série D (USOV, 1984). Vários grupos hidroxilas podem ser substituídos por éster sulfato, grupos metil, acetal de ácido pirúvico, e algumas vezes também são substituídos por monossacarídeos adicionais (USOV, 1998).

Portanto, os termos “agar” e “carragenana” designam uma fundamental diferença estereoquímica entre as moléculas polissacarídicas diastereoisoméricas (KNUTSEN et al., 1994).

Galactanas do tipo carragenanas geralmente são mais sulfatadas que as agaranas. As carragenanas também são substituídas por piruvato ou grupos metil, ainda que essas substituições sejam mais freqüentes nas agaranas (LAHAYE, 2001).

Na tentativa de abreviar as unidades galactosídicas, tendo em vista também as diferenças entre as galactanas do tipo agarana ou carragenana, Knutsen et al. (1994) propuseram o emprego de estenógrafos, de forma que as letras D e L seriam referidas a unidades 4-*O*-ligadas de D- e L-galactose, respectivamente, e que DA e LA corresponderiam aos seus respectivos derivados anidrogalactose. Segundo essa nomenclatura, pode-se observar na TABELA 1.2 algumas unidades monossacarídicas com suas correspondentes letras codificadas.

TABELA 1.2. Notações de unidades de açúcares e grupos substituintes de agaranas e carragenanas^a.

Letra codificada	Unidade monossacarídica correspondente
D	(1→4)- α -D-galactopiranosil
DA	(1→4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosil
G	(1→3)- β -D-galactopiranosil
L	(1→4)- α -L-galactopiranosil
LA	(1→4)-3,6-anidro- α -L-galactopiranosil
M	<i>O</i> -metil
P	4,6- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)
S	Ester sulfato
L2M,6S ^b	(1→4)-2- <i>O</i> -metil- α -L-galactopiranosil-6-sulfato
-G4S-DA-G-	→3)- β -D-galactopiranosil-4-sulfato – (1→4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosil – (1→3)- β -D-galactopiranosil – (1→

a = Tabela de LAHAYE, 2001. Nomenclatura segundo Knutsen et al. (1994).

b = número correspondente ao átomo de carbono o qual o substituinte está ligado.

Stortz e Cerezo (2000) caracterizaram as algas que sintetizam agaranas e carragenanas como agarófitas e carragenófitas, respectivamente. Recentemente, trabalhos estruturais de galactanas, com fracionamentos minuciosos e determinações das unidades enantioméricas, vêm demonstrando a existência de um terceiro grupo denominado por carrágar (CHOPIN; KERIN; MAZEROLLE, 1999) ou híbrido *DL* (STORTZ; CEREZO, 2000), onde as algas biossintetizam galactanas com uma estrutura entre agaranas e carragenanas (KNUTSEN et al., 1994).

Todavia, as galactanas obtidas de algas vermelhas, obedecem a uma mesma unidade estrutural comum (β -D-galactose 3-*O*-substituída e α -galactose 4-*O*-substituída), e a heterogeneidade no grau e tipo de substituição implica em suas propriedades físico-químicas e biológicas. Assim, o estudo da estrutura química fina dessas galactanas, é de grande importância na correlação entre suas estruturas e possíveis aplicações, industriais e/ou biológicas (FARIA, 2002).

1.2.1. Galactanas do tipo agarana

Ágar é uma mistura de polissacarídeos encontrados na matriz intercelular de rodófitas, especialmente nos membros das famílias *Gelidiaceae* e *Gracilariaceae* (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). Originalmente, Araki (1966 apud MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005) dividiu o ágar em dois grupos: agarose e agarpectina. A agarose seria um polissacarídeo neutro com uma estrutura linear baseada na repetição de unidades dissacarídicas denominadas de agarobiose [(1→3)- β -D-galactose e (1→4)-3,6-anidro- α -L-galactose], enquanto que a agarpectina seria um polissacarídeo ácido com sulfato, metil, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico adicionados à agarobiose.

A fim de evitar confusão entre ágar capaz de formar gel e ágar que não forma gel, Craigie (1990) propôs que o termo genérico “ágar” fosse substituído por “agarocolóides”, e que “agaranas” e “agaroides” fossem usados para designar famílias de polissacarídeos capazes de geleificar ou não, respectivamente.

Um pouco mais tarde, Knutsen et al. (1994) propuseram que o termo “agarana” fosse usado como nome genérico para estruturas extremas de polissacarídeos constituídos de unidades alternadas de (1→3)- β -D-galactose ligada a (1→4)- α -L-galactose (FIGURA

1.4), em oposição à “agarose”, na qual a unidade 4-O-ligada (unidade B) seria constituída somente pela forma 3,6-anidro (FIGURA 1.5, I). Todas as outras estruturas regulares conhecidas podem ser designadas como substituídas (metiladas, sulfatadas, etc.) derivadas de agaranas e agarose.

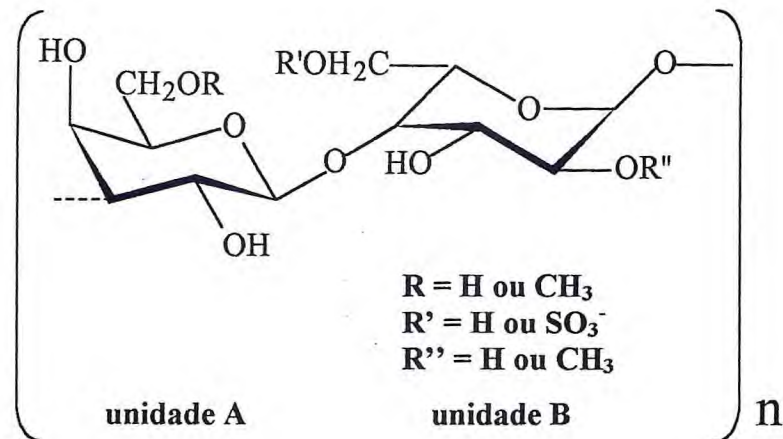


FIGURA 1.4. Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L-alternantes.

Outra variação estrutural muito comum é constituída por unidades A semelhantes àquelas encontradas na agarose, ao passo que as unidades B são substituídas pelo derivado α -L-galactose-6-sulfato (precursor biológico de 3,6-anidrogalactose). Dessa forma, esse extremo estrutural é denominado de “precursor da agarose” (FIGURA 1.5, II - NOSEDA; CEREZO, 1995).

Dentro do grupo das agaranas, a agarose é a galactana com maior propriedade geleificante, e substituição das unidades anidrogalactosídicas por unidades de α -L-galactopiranosose-6-sulfato reduz consideravelmente a propriedade de geleificação, enquanto que a introdução de grupos metil em C-6 tem pouca influência sobre tal propriedade (USOV; IVANOVA; SHASHKOV, 1983).

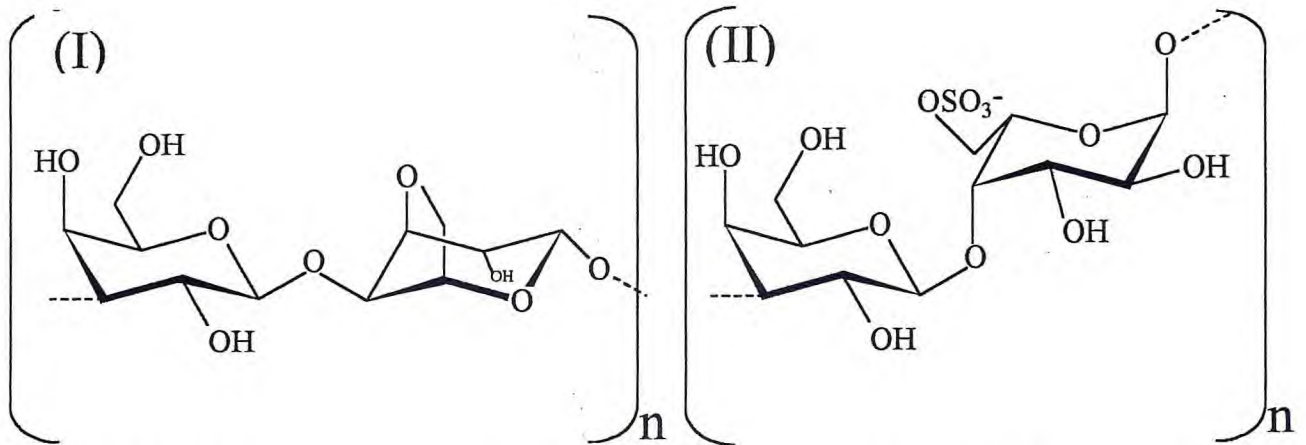


FIGURA 1.5. Estruturas extremas encontradas em agaranas: Agarose (I); Precursor da Agarose (II).

Vários estudos estruturais de polissacarídeos do tipo agarana, principalmente das ordens Ceramiales, Gelidiales e Gracilariales, têm demonstrado uma grande variabilidade no grau e tipo de grupos substituintes. Estudos por RMN de ^1H e ^{13}C da galactana obtida de *Gracilaria edulis*, submetida ao tratamento alcalino, revelaram uma unidade dissacarídica constituída por (1 \rightarrow 3)-6-*O*-metil- β -D-galactopiranosose e (1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, com parcial metoxilação em C-2 da unidade B. Foi observado ainda parcial sulfatação em C-4 da unidade A, altamente metilada, embora esse padrão de sulfatação seja mais comum em galactanas do tipo carragenana (VILLANUEVA; MONTAÑO, 1999).

A agarana isolada de *Acanthophora spicifera* apresentou elevados teores de sulfato em C-2 das unidades β -D-galactopiranosose, com algumas unidades A ainda piruvatadas. As unidades B são formadas principalmente por 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e pelo seu precursor biológico, α -L-galactopiranosose-6-sulfato (DUARTE et al., 2004).

Segundo Cassolato (2004), os polissacarídeos sulfatados obtidos das algas *Amansia multifida* e *Osmundaria obtusiloba* apresentam um padrão distinto dos descritos na literatura para a família Rhodomelaceae (Ceramiales), por possuírem frações ricas em xilanas neutras e agaranas com elevados teores de metilação em C-3, respectivamente.

Um outro tipo estrutural obtido das algas dos gêneros *Porphyra* e *Bangia*, denominado por porfirana (FIGURA 1.6), é semelhante à agarose, pois é constituído por unidades β -D-galactopirranose ligadas a unidades α -L-galactopirranose ou seu derivado 3,6-anidro. A substituição por grupos sulfato ocorre somente em C-6 das unidades α -L-ligadas, podendo ocorrer metoxilação em C-6 das unidades β -D-ligadas (NOSEDA et al., 2000).

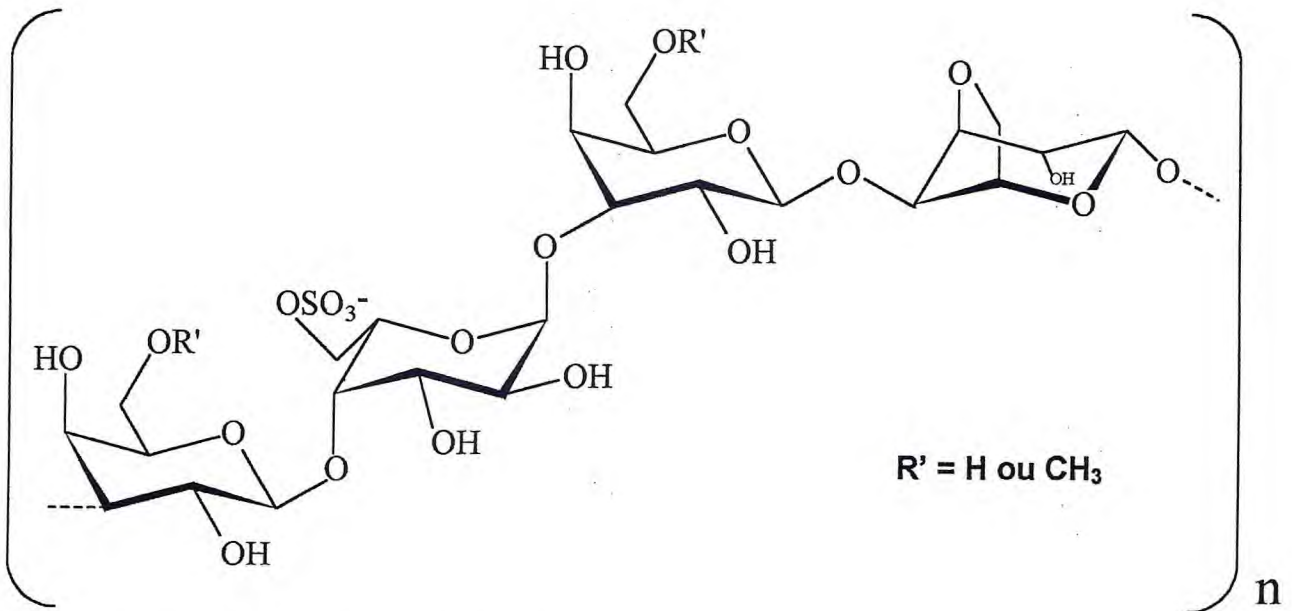


FIGURA 1.6. Estrutura básica das porfiranas.

1.2.2. Galactanas do tipo carragenana

As carragenanas são polissacarídeos lineares sulfatados extraídas de rodófitas, e vários membros das famílias Solieriaceae e Gigartinaceae são relatados como importantes fontes de tipos especiais de carragenanas muito usados industrialmente (VILLANUEVA et al., 2004). Sua cadeia polissacarídica é essencialmente constituída por unidades (1→3)-β-D-galactopiranosose (unidade A) ligadas a (1→4)-α-D-galactopiranosose (unidade B), portanto ambas as unidades pertencem à série D (FIGURA 1.7 - USOV, 1998).

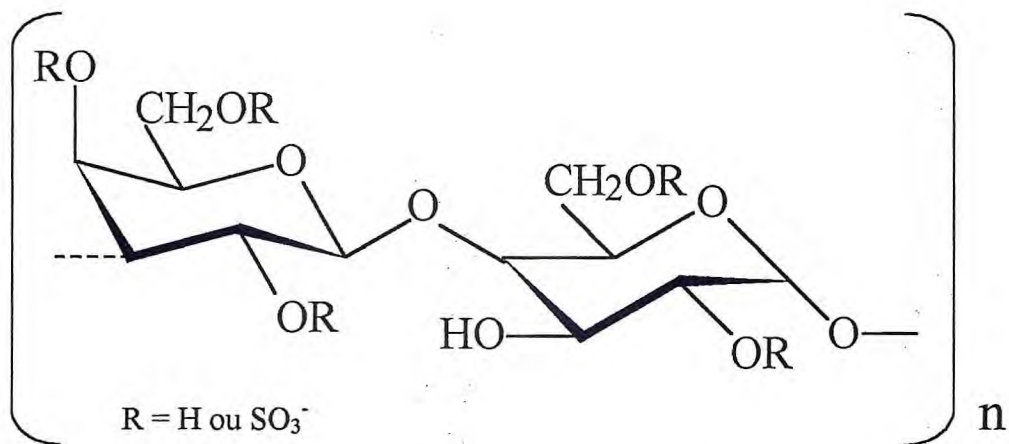


FIGURA 1.7. Estrutura básica repetitiva de carragenanas, com unidades D- alternantes.

A estrutura de vários tipos de carragenanas é definida pelo número e posição dos grupos sulfato, e pela presença ou ausência de 3,6-anidrogactose (AMIMI et al., 2001; PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003). Dessa forma, Knutsen et al. (1994) propuseram uma classificação para os tipos diferentes de carragenanas com o uso de letras gregas, originando 15 espécies de estruturas distintas, divididas dentro de 3 famílias. Mais tarde, Cauduro et al. (2000) dividiram as espécies de carragenanas em 4 famílias de acordo com a substituição ou não pelo grupo sulfato na unidade A (TABELA 1.3).

TABELA 1.3. Classificação das carragenanas de acordo com a substituição das unidades^a.

Família	Unidade A (1→3) ^b	Unidade B (1→4) ^b	Carragenanas
Kappa	G4S ^c	DA	κ (kappa)
	G4S	DA2S	ι (iota)
	G4S	D6S	μ (mu)
	G4S	D2S,6S	ν (nu)
	G4S	D2S	ο (omicron)
Lambda	G2S	D2S,6S	λ (lambda)
	G2S	D2S	ξ (xi)
	GP,2S	D2S	π (pi)
	G2S	DA2S	θ (theta)
Omega	G6S	DA	ω (omega)
	G6S	D6S	ψ (psi)
Beta	G	DA	β (beta)
	G	DA2S	α (alpha)
	G	D6S	γ (gamma)
	G	D2S,6S	δ (delta)

a = adaptada de Faria (2002) e Lahaye (2001).

b = unidades de galactose 1,3- e 1,4-ligadas.

c = letras: G: β-D-galactopiranosil, D: α-D-galactopiranosil, DA: 3,6-anidro- α-D-galactopiranosil, S: sulfato, P: piruvato, números correspondentes ao átomo de carbono no qual a substituição é encontrada. Nomenclatura segundo Knutsen et al. (1994).

A lambda-carragenana é a carragenana mais sulfatada (G2S-D2,6S). Hélices ordenadas não são formadas por essa estrutura, por conseguinte a lambda-carragenana não forma gel. As espécies formadoras de gel geralmente apresentam a unidade B na forma de 3,6-anidrogactose (PICULELL, 1995).

Carragenanas naturais geralmente apresentam complexas estruturas híbridas que são uma mistura de carragenanas de diferentes tipos, nas quais as proporções e as estruturas variam de acordo com as espécies, condições ecofisiológicas e ambientais (AMIMI et al., 2001). Em particular, estágios do ciclo reprodutivo de espécies da família Gigartinaceae afetam as estruturas de suas carragenanas, a alga *Gigartina pistillata* biossintetiza na sua fase gametofítica um heteropolissacarídeo constituído majoritariamente por kappa/iota-

carragenana, e baixas proporções de nu-carragenana. Já na fase tetrasporofítica a alga biossintetiza um complexo de lambda/xi/pi-carragenana, com grande parte das unidades A 2,6-dissulfatadas (AMIMI et al., 2001). O sistema de polissacarídeos da fase cistocárpica da alga *Gigartina skottsbergii* é composto por carragenanas geleificantes com características kappa/iota e uma solúvel, parcialmente ciclizada, mu/nu-carragenana, possuindo também pequenas proporções de galactanas sulfatadas contendo L-galactose. E na fase tetrasporofítica a alga sintetiza lambda-carragenana (MATULEWICZ et al., 1989).

A ocorrência de híbridos kappa/iota-carragenana é bastante comum na natureza, que geralmente os produz em diferentes razões kappa/iota, dependente das espécies produtoras (VAN DE VELDE et al., 2001). Em geral, algas das famílias Gigartinaceae e Phyllophoraceae produzem híbridos kappa/iota-carragenana e iota/kappa-carragenana, respectivamente (FURNEAUX; MILLER, 1985).

A heterogeneidade em carragenanas pode, em princípio, ocorrer numa mesma cadeia polissacarídica ou em cadeias separadas. No último caso, a amostra é uma mistura de diferentes espécies poliméricas e frações homogêneas podem ser facilmente obtidas por precipitações salinas. Um exemplo bem conhecido é o efeito de íons de potássio, onde concentrações de 0,25 M são capazes de separar frações kappa/iota-carragenana de lambda-carragenana pela formação de frações insolúveis e solúveis, respectivamente. No caso de espécies mistas de carragenanas ocorrerem numa mesma cadeia, as heterounidades podem ser distribuídas aleatoriamente, regularmente em uma seqüência alternada, ou ainda em blocos (PICULELL, 1995).

Quando van de Velde et al. (2001) estudaram as carragenanas híbridas kappa/iota comerciais produzidas pelas algas vermelhas *Sarcothalia crispata*, *Mazaella laminarioides* e *Chondrus crispus*, com o objetivo de estabelecer se as carragenanas híbridas consistiam de uma cadeia mista (com unidades kappa e iota presentes na mesma cadeia) ou se elas seriam uma mistura de cadeias puras de kappa e iota, usando técnicas de reologia e rotação óptica, e comparações com estruturas de kappa e iota puras e ainda uma mistura de kappa + iota feita manualmente, concluíram que as carragenanas híbridas kappa/iota sintetizadas por essas algas tratavam-se de uma cadeia mista contendo ambas as espécies que, por sua vez, poderiam estar ordenadas aleatoriamente ou em blocos.

1.2.3. Galactanas do tipo híbrido D/L

Galactanas híbridas D/L são galactanas nas quais suas unidades B apresentam-se tanto na configuração D- quanto L- na mesma molécula (FIGURA 1.8). Quando a molécula é constituída principalmente por carragenanas (α -D-galactose), a galactana híbrida é denominada carragenana-híbrida-D/L, mas quando as principais unidades dissacarídicas são moléculas de agaranas (α -L-galactose), o polímero híbrido é denominado de agarana-híbrida-D/L (ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2004).

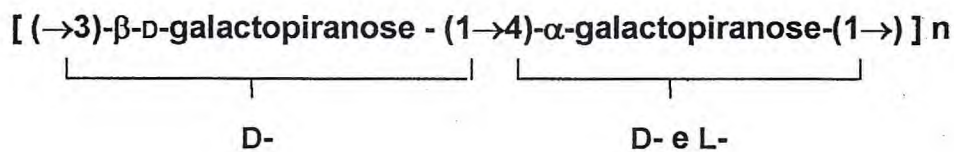


FIGURA 1.8. Unidades repetitivas presentes nas galactanas híbridas D/L com unidades B podendo ocorrer nas configurações D- e L-.

Durante os últimos anos, alguns trabalhos têm demonstrado que algas pertencentes às famílias Gigartinaceae, Halymeniaceae, Phylloporaceae e Solieriaceae, as quais são consideradas típicas carragenófitas, produzem além de carragenanas, agaranas sulfatadas ou carragenanas-híbridas-D/L sulfatadas (CIANCIA; MATULEWICZ; CERZO, 1997; ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2000, 2001, 2004; ZIBETTI et al., 2005). De outra forma, investigações de polissacarídeos obtidos de agarófitas tais como: *Digenea simplex* (Ceramiales – TAKANO et al., 2003) e *Porphyra columbina* (Bangiales – NAVARRO; STORTZ, 2003) demonstraram a presença de pequenas quantidades de unidades B pertencentes à série D.

Atualmente, todas essas evidências levam a crer que a presença de carragenanas e agaranas numa estrutura polimérica, não é característica de um gênero, e que a divisão tradicional das algas vermelhas em carragenófitas e agarófitas pode ser mantida se referida

ao tipo principal de polissacarídeos biossintetizado pela alga marinha (ZIBETTI et al., 2005).

O uso de fracionamento por precipitação diferenciada com KCl mostrou que a alga vermelha *Gymnogongrus torulosus* (Phyllophoracea) produz um sistema complexo com carragenanas geleificantes com características kappa/iota, e um outra solúvel mu/nu-carragenana. Entretanto, análises enantioméricas dos açúcares componentes e unidades estruturais mostraram que a carragenana geleificante possuía unidades B (em baixas percentagens) na forma D- e L-. Por sua vez, a fração solúvel em KCl após tratamento alcalino e reprecipitação com KCl, apresentou frações de agarana, frações geleificantes do tipo carragenana-híbrida-D/L e fração solúvel com caráter agarana-híbrida-D/L (ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2001). Segundo os mesmos autores, ainda não existe uma metodologia adequada para o fracionamento dessas moléculas híbridas-D/L. Contudo, a técnica relativamente útil conhecida até o momento é baseada nas propriedades formadoras de gel, das cadeias regulares de kappa/iota-carragenanas, dependente das suas interações específicas com o íon potássio. Uma vez que estas interações permitem a precipitação fracionada de diferentes tipos de carragenanas, esse processo facilita o isolamento de galactanas híbridas-D/L.

Segundo Estevez, Ciancia e Cerezo (2004), moléculas de carragenanas têm pouca interação intermolecular, e este fato é a base do fracionamento com cloreto de potássio. Uma clara interação carragenana-carragenana é a co-solubilização de mu/nu-carragenanas com frações de lambda-carragenana em solução de KCl 2 M. De outra forma, a retenção de pequenas, mas significativas quantidades de galactanas solúveis contendo L-galactose por precipitação com KCl de kappa/iota-carragenanas de *Gigartina skottsbergii*, *Kappaphycus alvarezii* e *Gymnogongrus torulosus*, as quais são reduzidas ou desaparecem após metilação, é consistente com a agregação dessas carragenanas com fragmentos de agaranas de baixa massa molar. Essa complexação pode ser reduzida ou eliminada por tratamento alcalino. Ao contrário das carragenanas, as agaranas são muito mais susceptíveis à complexação.

Dessa forma, quando essa técnica é aplicada a sistemas contendo híbridos-D/L, há a formação de gel por parte das frações kappa/iota-carragenanas, enquanto que as frações mu/nu, parcialmente ciclizadas, permanecem solúveis, junto com porções de

agaranas e híbridos contendo agaranas como principal constituinte (agarana-híbrida-D/L), em solução de KCl 2 M (ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2001).

Ainda que a precipitação salina não seja uma técnica adequada para fracionar de forma eficiente misturas de polissacarídeos “diastereoisômeros”, tem favorecido a obtenção de moléculas homogêneas, as quais são consideradas como galactanas híbridas D/L. Considerações importantes devem ser dadas também ao fato de que algas marinhas concentram grandes quantidades de cálcio e magnésio, e que esses cátions divalentes podem contribuir para a complexação de polissacarídeos sulfatados, dificultando sobremaneira o fracionamento dessas moléculas (ZIBETTI et al., 2005).

A alga marinha *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae) biossintetiza uma família de galactanas híbridas D/L. Duas frações homogêneas, C1S-3 e C2S-3, foram obtidas. As unidades A de C1S-3 são constituídas principalmente por unidades de β -D-galactose, enquanto em C2S-3 por unidades de β -D-galactose também não substituídas ou ainda 2-sulfatada e 2,6-dissulfatadas. Acetal de ácido pirúvico substitui os carbonos 4,6 de ambas galactanas. Em suas unidades B estão representadas por monossacarídeos pertencentes tanto à série estereoquímica D- como L-, comprovando assim o caráter híbrido destas galactanas. (ZIBETTI et al., 2005).

1.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS

Durante muito tempo, os polissacarídeos obtidos das algas marinhas têm sido amplamente utilizados pelas indústrias alimentícias, de papel, têxtil, petroquímica, entre outras, devido a suas propriedades de retenção de água, formação de géis e emulsões. Porém, nos últimos anos as indústrias farmacêuticas e muitas instituições acadêmicas têm voltado seus interesses para esses hidrocolóides devido a suas potentes aplicações farmacêuticas, biomédicas e biotecnológicas (SMIT, 2004).

Dentre as várias atividades biológicas testadas, os polissacarídeos sulfatados são bastante reconhecidos por suas atividades antiherpéticas (CARLUCCI et al., 1997; DUARTE et al., 2001b, 2004; GHOSH et al., 2004; MAJCZAK et al., 2003; MAZUMDER

et al., 2002; TALARICO et al., 2004), antitumoral (COOMBE et al., 1987; FERNÁNDEZ et al., 1989; HIROISHI et al., 2001; ZHOU et al., 2004), anticoagulante e antitrombótica, sendo essas últimas, as mais amplamente estudadas (CHEVOLOT et al., 1999; FARIAS et al., 2000; GÜVEN; ÖZSOY; ULUTIN, 1991; HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000; HAYAKAWA et al., 2000; MATSUBARA et al., 2001; MELO et al., 2004; SIDDHANTA et al., 1999; TRENTO et al., 2001).

Em geral, a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas está relacionada ao tamanho da molécula, tipo de unidades constituintes e conteúdo de sulfato. A posição dos grupos sulfato, tipo de ligação e geometria da molécula também são importantes para a atividade biológica (MELO et al., 2004). Diferentes características estruturais determinam não só a atividade biológica, mas também seu mecanismo de ação (PEREIRA; MULLOY; MOURÃO, 1999). *In vivo*, os polissacarídeos sulfatados são expostos a um complexo ambiente contendo numerosas proteínas em solução, nas superfícies celulares e na matrix extracelular, e como consequência de suas estruturas iônicas, podem interagir ligando-se a um grande número de proteínas (BOISSON-VIDAL et al., 1995). A distribuição da carga negativa de grupos sulfatos pode constituir um padrão o qual provavelmente reconhece alvos biológicos tais como proteínas envolvidas na coagulação sanguínea (AT e HCII) ou de proliferação celular (receptores de fatores de crescimento - HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000)

A influência dos grupos sulfato é patente. Fucanas naturais submetidas à sulfatação química (oversulfatação) demonstraram uma acentuação de seu efeito antitumoral e anti-angiogênico (KOYANAGI et al., 2003). Perda da atividade anticoagulante foi observada após dessulfatação de uma fração polissacarídica de *Codium dwarkense* (SIDDHANTA et al., 1999). Assim, vários polissacarídeos de vegetais superiores exibem algumas atividades semelhantes àsquelas de polissacarídeos de algas marinhas quando são sulfatados quimicamente (ONO et al., 2003).

Com bases nas características das moléculas, muitos autores vêm tentando correlacionar estrutura *versus* atividade biológica (CARLUCCI et al., 1997; DUARTE et al., 2004; MAZUMDER et al., 2002).

Várias carragenanas, incluindo frações kappa/iota/nu homogêneas (G3d) e híbridas DL (C2S-3) das algas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata*,

respectivamente, apresentaram atividade seletiva contra o vírus simplex da herpes do tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2). Embora as frações mais ativas tenham apresentado altos teores de sulfato, este não é o único fator responsável pela atividade em estudo desde que algumas galactanas, com similares quantidades de sulfato, apresentaram comportamento diferente. Dessa forma, outros fatores estruturais, tais como: grau de polimerização e posição dos grupos sulfato na cadeia polimérica, podem também estar relacionados com a atividade antiviral (TALARICO et al., 2004).

Dentre as agaranas obtidas de *Bostrychia montagnei*, com unidades A parcialmente C-4 sulfatadas, e unidades B totalmente sulfatadas em C-3, e em menores proporções em C-2 e C-6 (DUARTE et al., 2002), algumas apresentaram atividade contra HSV-1 e HSV-2, enquanto outras foram totalmente desprovidas de atividade antiherpética. Além da influência já relatada pelos grupos sulfato, a atividade foi relacionada também à massa molar, visto que as frações ativas apresentaram esses parâmetros mais elevados (DUARTE et al., 2001b).

O polissacarídeo de alta massa molar obtido da alga verde *Caulerpa racemosa*, constituído principalmente por galactose, glucose, arabinose e xilose, com ramificações de glucose e xilose, metoxilação em C-6 da galactose e C-3 da arabinose e baixa sulfatação, apresentou seletivo efeito contra as diferentes cepas do vírus da herpes. Apesar da fração ativa ter sido submetida à dessulfatação, com perda de 97 % de sulfato, não foi observada uma correspondente perda da atividade antiherpética. Logo, uma correlação entre estrutura e atividade biológica não foi claramente estabelecida. Para exibir atividade antiviral, a massa molar do polímero deve ser no mínimo 5-10 KDa e a molécula possuir mais que 2 grupos sulfato por unidade de açúcar. Porém, deve ser enfatizado que aspectos estruturais e conformacionais do polímero, tais como: densidade de carga e/ou distribuição das cargas também desempenham importante papel nas propriedades antivirais. Portanto, elevada massa molar, parcial sulfatação e outras características estruturais ainda não elucidadas, podem ter sido suficientes para manter a atividade antiherpética na fração dessulfatada (GHOSH et al., 2004).

Lambda-carragenana obtida de *Chondrus ocellatus*, e mais cinco subprodutos obtidos por degradação em microondas do polímero nativo, com diferentes massas molares foram investigados quanto à atividade antitumoral em ratos. Diferente da atividade

antiherpética, onde elevadas massas molares parecem contribuir com a atividade, as frações de menores massas se mostraram mais ativas na inibição das células tumorais das linhagens S180 e H22 (ZHOU et al., 2004).

Da mesma forma, fucanas de baixas massas molares (FBMM) extraídas de *Ascophyllum nodosum*, exibiram atividade antiproliferativa inibindo a proliferação de fibroblastos (CCL39) e células de adenocarcinoma do cólon sigmóide (Colo 320DM). Todavia, não foram detectados efeitos sobre a leucemia linfocítica (P388) e câncer de mama (MCF7, MCF7ras – ELLOUALI; DURAND; JOZEFONVICZ, 1993). Essas frações também foram ativas quando testadas quanto ao efeito anticoagulante, sendo as sulfatações em C-2 e C-3 importantes para essa atividade, enquanto que sulfato em C-4 parece não ter influência. Um mínimo de massa molar requerida para atividade anticoagulante de FBMM ainda não foi claramente estabelecida, devido à ocorrência de reações nas cadeias laterais, o que poderia gerar polímeros ativos com massas molares reduzidas (CHEVOLOT et al., 1999).

Haroun-Bouhedja et al. (2000) investigaram o efeito anticoagulante e antiproliferativo de fucanas sulfatadas de baixa massa molar. Os resultados demonstraram que o requerimento dos grupos sulfato para ambas as atividades é diferente, visto que o decréscimo na sulfatação diminui as duas atividades, mas não da mesma maneira. Segundo os autores, 20% de sulfato é o mínimo necessário para a obtenção de um efeito anticoagulante, enquanto que frações com graus de sulfatação mais baixos, sem atividade anticoagulante, ainda mantinham sua habilidade de inibir o crescimento de células.

A alga vermelha *Botryocladia occidentalis* biossintetiza uma galactana cujo 1/3 das suas unidades B é 2,3-*O*-dissulfatada e outro 1/3 é apenas 2-*O*-sulfatada. Essa galactana apresentou uma potente atividade anticoagulante (similar à potência da heparina) e possivelmente a adição de dois grupos sulfato na unidade B tenha um “efeito amplificador” da ação anticoagulante, devido ao aumento da densidade de carga do polímero (FARIAS et al., 2000).

A atividade antiplaquetária de carragenanas obtidas comercialmente mostrou que a agregação induzida por ADP foi parcialmente inibida por iota-carragenana, enquanto lambda- e kappa-carragenana não tiveram nenhum efeito sobre a agregação plaquetária (GÜVEN; ÖZSOY; ULUTIN, 1991).

1.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE COAGULAÇÃO

A manutenção do sangue fluido nos vasos, sem formação de coágulos (trombose) e a interrupção do extravasamento de sangue (hemorragia) no local de injúria vascular, é resultado de mecanismos que interagem de maneira regulada, correspondentes ao fenômeno denominado de hemostasia (PEREIRA, 2002; TERRA, 2004).

Tomando o vaso lesado como referência, basicamente há o envolvimento de quatro fases para a manutenção da hemostasia: (1) Constrição do vaso injuriado para diminuir o fluxo sanguíneo distal à injúria. (2) Formação de um agregado plaquetário frouxo e temporário, no sítio da injúria. As plaquetas se ligam ao colágeno no sítio da injúria da parede do vaso, sendo ativadas pela trombina, formada na cascata de coagulação no mesmo sítio, ou por liberação de ADP a partir de outras plaquetas ativas. Durante a ativação, as plaquetas alteram suas formas, na presença de fibrinogênio, e se agregam para formar o tampão hemostático ou o trombo. (3) Formação de uma malha de fibrina que se liga ao agregado plaquetário, formando um tampão hemostático mais estável ou trombo. (4) Dissolução parcial ou completa do tampão hemostático ou trombo, pela plasmina (RAND; HARFENIST; MURRAY, 1998). A FIGURA 1.9 mostra de forma resumida as etapas para a formação do trombo hemostático.

Portanto, os eventos envolvidos na coagulação são iniciados quando alguns constituintes do tecido se liberam da parede vascular lesada (fator tecidual) e caem no sangue local. Como a ocorrência é concomitante com a vasoconstricção, há a concentração local do fator tecidual, o qual é indispensável ao desencadeamento das ativações dos fatores plasmáticos da coagulação. As formas inativas destes fatores são constituintes normais do sangue circulante. Concentrado no local da lesão, o fator tecidual permitirá que o fator plasmático VII passe à forma ativa, e o ajuda a produzir seu efeito, que é ativar o fator plasmático subsequente. Este, ativado, ativa o seguinte e, assim por diante, compondo-se uma cadeia de fatores ativados, todos em concentração alta, até a fibrina, obtida na última reação. A grande quantidade de fibrina que se forma no local supera o ritmo normal da fibrinólise, levando ao necessário acúmulo da fibrina (FIGURA 1.10 - TERRA, 2004).

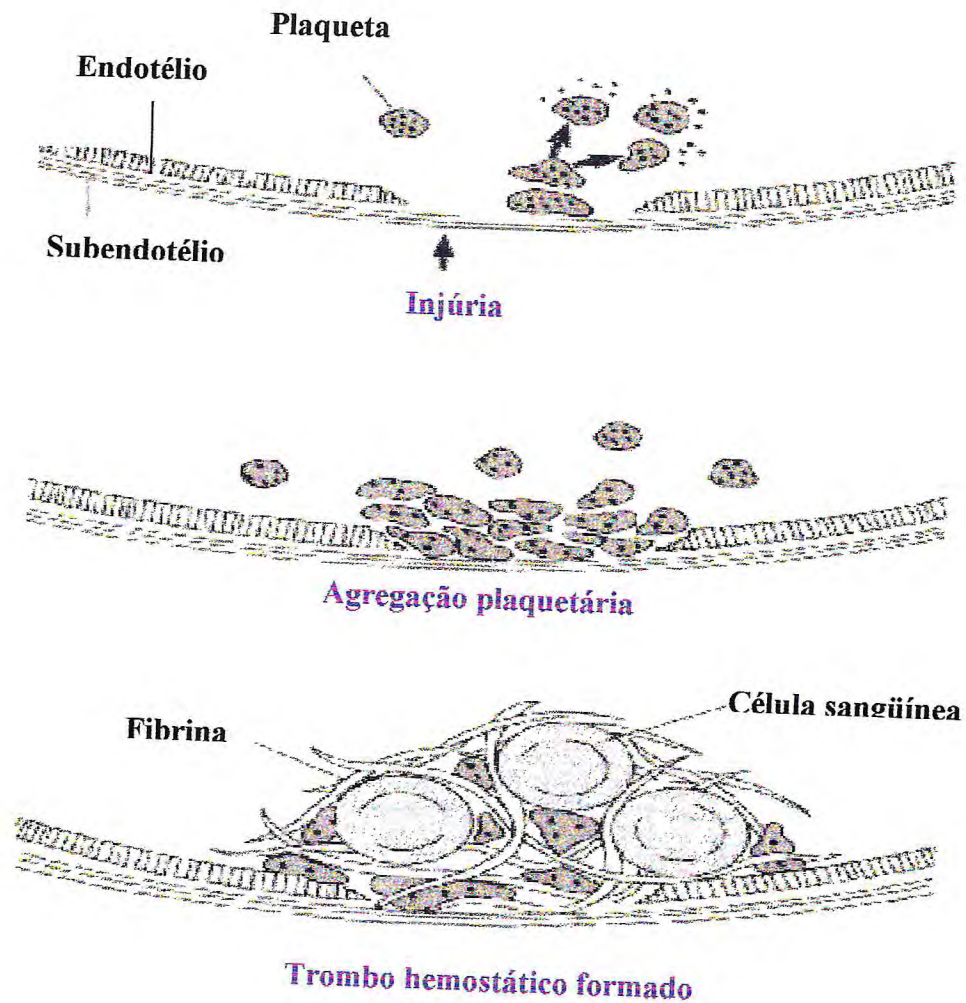


FIGURA 1.9. Etapas do processo de formação do tampão hemostático.

Fonte: <www.geocities.com>

As plaquetas são uma fonte de fosfolípidios indispensáveis à ativação dos fatores que levam à formação da fibrina. Por outro lado, as plaquetas que aderem ao colágeno exposto pela lesão são ativadas na dependência da trombina, o mesmo fator que ativa o fibrinogênio. Este, por sua vez, favorece a agregação das plaquetas. O gel de fibrina se une ao trombo plaquetário, aumentando a eficiência do efeito mecânico de tamponamento (TERRA, 2004).

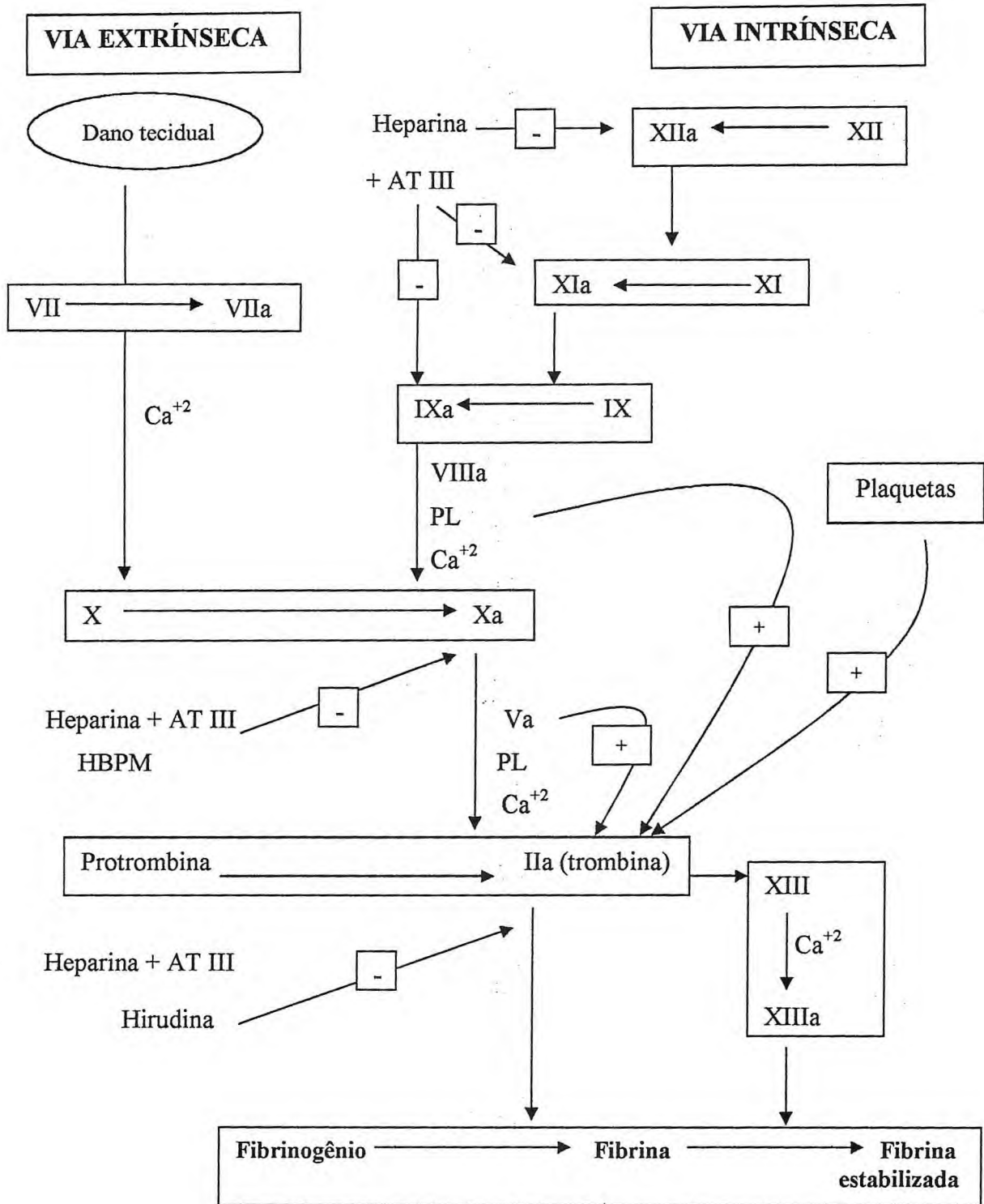


FIGURA 1.10. A cascata de coagulação sangüínea com os locais de ação dos anticoagulantes, demonstrando interações e regulações nas vias extrínseca e intrínseca. PL – fosfolípídeo com carga negativa; AT III – antitrombina III; HBPM – heparinas de baixo peso molecular (BICK, MURANO, 1994).

Esquemáticamente, a coagulação pode ser dividida em vias extrínseca e intrínseca, ambas convergindo para o ponto onde o fator X é ativado. Em condições fisiológicas, no entanto, estes dois sistemas não podem ser considerados isoladamente porque estão acoplados por uma série de reações. Evidências mais recentes demonstram que a via extrínseca é crítica para o início da coagulação, enquanto a via intrínseca exerce um papel importante no crescimento e manutenção do coágulo. Desta forma, a divisão entre essas duas vias é útil apenas na interpretação dos testes de avaliação da hemostasia, onde as reações ocorrem *in vitro* (PEREIRA, 2002).

Como pode ser observado na FIGURA 1.10, a via extrínseca se constitui da soma do fator VII (único fator exclusivo da via extrínseca) com os fatores da via comum (X, V, II, I). A via intrínseca se constitui da soma dos fatores exclusivos dela (XII, XI, IX, VIII) com os fatores da via comum.

Pela convenção internacional que recomenda o uso de algarismos romanos para os fatores da coagulação, o fibrinogênio é o fator I. Portanto, a última etapa da cadeia é a da ativação do constituinte de número mais baixo. Os números mais altos correspondem às etapas iniciais. Eis porque se costuma comparar o processo com uma cascata. Nessa convenção, as formas ativas devem conter um “a” minúsculo após o número do fator correspondente (TERRA, 2004).

1.4.1. Ativação plaquetária

As plaquetas são corpúsculos que participam diretamente dos mecanismos de hemostasia e coagulação sanguínea, originados a partir da fragmentação de megacariócitos. Apresentam a forma de minúsculos discos arredondados, sem núcleo, com diâmetro médio de 1,5 a 4 microns. Quando ativadas, as plaquetas aumentam suas proporções consideravelmente. A estrutura interna complexa está relacionada à função desempenhada nos processos de hemostasia e coagulação. A superfície externa das plaquetas está recoberta por uma camada denominada glicocálix, rica em glicoproteínas, as quais são importantes para as funções de adesividade e agregação, e permitem assim, a aderência à superfície do endotélio vascular lesado e a interação plaqueta-plaqueta, constituindo os

futuros coágulos. Também estão presentes no glicocálix os receptores para diversos agentes capazes de ativar as plaquetas (SILVA, 2004).

As plaquetas permanecem circulantes no plasma em forma não estimulada. No momento de injúria fatores de ativação, como glicoproteínas e colágeno, secretados pelas células endoteliais, são lançados na corrente sanguínea estimulando a ativação plaquetária via receptores específicos na superfície externa da plaqueta. O fenômeno de ativação compreende três processos: adesão ao colágeno exposto nos vasos sanguíneos, liberação dos conteúdos granulares (incluindo ácido aracdônico) e a agregação. As plaquetas aderem ao colágeno via receptores como o complexo glicoprotéico GPIa/IIa, em uma reação que envolve o fator de von Willebrandt (FIGURA 1.11). A própria ativação plaquetária, seguida da liberação dos grânulos, implica na estimulação e conseqüente ativação de plaquetas adjacentes, as quais irão compor o trombo ou coágulo. Processos de regulação deste sistema mantêm limitada a formação do trombo ao local da injúria (RAND; HARFENIST; MURRAY, 1998).

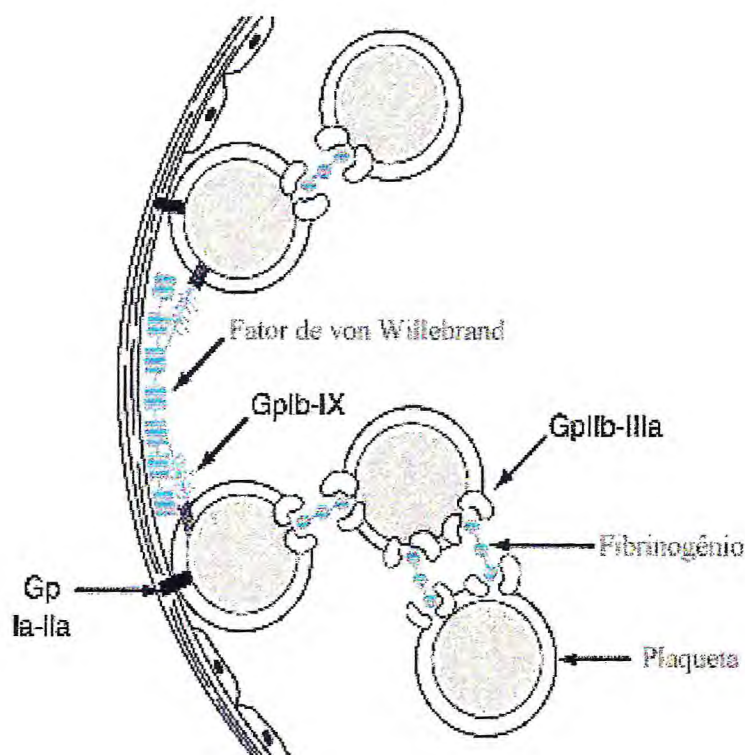


FIGURA 1.11. Mecanismo de ativação plaquetária a partir do receptor glicoprotéico GPIIbIIIa. Fonte: <www.geocities.com>

A trombina formada a partir da cascata de coagulação, representa o mais potente ativador plaquetário nos sistemas *in vivo*. Através da interação com seu receptor, estimula a atividade de uma fosfolipase, denominada fosfolipase-C, situada na membrana plasmática. A ação dessa enzima permite a liberação dos vários tipos de grânulos, inclusive o ADP (difosfato de adenosina), o qual é liberado nos grânulos densos e que também pode interagir com plaquetas, resultando na ativação de um maior número delas (RAND; HARFENIST; MURRAY, 1998).

Todos os agentes agregantes modificam a superfície da plaqueta permitindo, assim, a aderência de fibrinogênio à superfície da plaqueta ativada. Moléculas de fibrinogênio ligam entre si plaquetas adjacentes ativadas, formando um agregado importante na constituição do trombo (RAND; HARFENIST; MURRAY, 1998).

1.4.2. Drogas anticoagulantes, antitrombóticas e antiplaquetárias

Várias substâncias antitrombóticas, tais como: warfarin (antagonista da vitamina K), hirudina, agatroban, inogatran (inibidores direto da trombina), dentro outras, têm sido alvo de estudos. Entretanto, a heparina é certamente o composto mais utilizado atualmente para o tratamento e prevenção da trombose (PEREIRA, 2002).

Porém, o uso prolongado da heparina tem sido associado à redução do número de plaquetas circulantes. Essa trombocitopenia induzida pela heparina (TIH) na maioria dos casos é assintomática. Entretanto, em determinadas circunstâncias, os pacientes podem apresentar complicações significativas, tanto de natureza hemorrágicas quanto trombóticas (JESKE et al., 1997). A TIH parece estar relacionada ao aparecimento gradual de anticorpos anti-heparina. Uma parte das moléculas da heparina administrada aos pacientes liga-se à membrana das plaquetas. Os anticorpos anti-heparina atuam sobre as moléculas de heparina incorporadas à membrana das plaquetas. Por conseguinte os anticorpos ativam as plaquetas, estimulam a liberação do conteúdo dos grânulos do citoplasma e produzem aglomerados plaquetários. A associação de injúria endotelial de natureza imunológica e a ativação do complemento produzida pela reação dos anticorpos podem propiciar as condições para a adesão de plaquetas e a subsequente formação de trombos (ELIAS; SOUZA, 2005).

Outra desvantagem da heparinoterapia está relacionada aos baixíssimos rendimentos da heparina obtida principalmente de intestino de porco ou de pulmão bovino. Sua obtenção a partir de tecidos animais também restringe seu uso devido à possibilidade de contaminação viral. A incidência de doenças prion-relatadas em mamíferos e o aumento da demanda mundial por terapias antitrombóticas abrem caminho para a descoberta de novas alternativas de compostos anticoagulantes e antitrombóticos (MELO et al., 2004).

As heparinas de baixa massa molecular são fragmentos derivados da heparina convencional, desenvolvidas num esforço de promover uma inibição mais seletiva da função enzimática, reduzindo dessa forma os efeitos adversos da heparina não fracionada. No entanto, vários testes clínicos vêm demonstrando que não existem diferenças significativas na incidência de sangramento entre heparina não fracionada e seus derivados de baixa massa molar (THOMAS, 1997).

Recentemente nos Estados Unidos, fucanas sulfatadas obtidas das algas *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum* foram patenteada com a sugestão de serem substitutas da heparina, por serem dotadas de atividade antitrombótica e antiinflamatória, desprovidas de problemas causados pela heparina de origem animal (CEDRO et al., 1999).

A atividade anticoagulante de polissacarídeos de algas marinhas foi primeiramente relatada por Chargaff, Bancroft e Stanley-Brown (1936 apud SIDDHANTA et al., 1999). Desde então, diversas algas, na maioria pardas e vermelhas, têm sido reportadas como possuidoras de polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante, fibrinolítica, antitrombótica e agregante plaquetária (SIDDHANTA et al., 1999).

Conhecendo e entendendo as vias pelas quais ocorre a ativação plaquetária, torna-se possível o emprego de drogas planejadas para atuar especificamente na prevenção ou tratamento de patologias desta natureza. Um ponto em comum entre os agentes capazes de promover a agregação é sua especificidade por um receptor da membrana. Desse modo, a ação do antiplaquetário pode estar centralizada desde a inibição em nível de receptor até a degradação ou interferência no metabolismo dos agentes agregantes (FERREIRA, 2001).

Antiagregantes sintéticos podem atuar como antagonistas de agentes endógenos bloqueando seu sítio de ligação ou inibindo a ação de enzimas que atuam na formação de efetores da agregação. É o caso, por exemplo, da aspirina a qual é capaz de modificar o comportamento plaquetário acetilando, irreversivelmente a ciclooxigenase, alterando desse

modo, o metabolismo do ácido aracdônio e, conseqüentemente a síntese de tromboxano A_2 , um potente agregante de plaquetas, bem como um vasoconstritor, inibindo a agregação plaquetária (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Com esse enfoque, as drogas que estão sendo atualmente testadas atuam na inibição da síntese de tromboxano A_2 (ou no bloqueio de seu sítio de ligação) e no bloqueio ao receptor glicoprotéico IIb/IIIa, uma vez que o mesmo é considerado como a via final comum da agregação plaquetária (FIGURA 1.11). Isso tem gerado interesse na investigação de antagonistas para o sítio dessa glicoproteína, visando efeitos mais específicos e com menores reações adversas. O complexo glicoprotéico IIb/IIIa é um heterodímero presente nas plaquetas e megacariócitos e seu principal ligante é o fibrinogênio. A ligação da molécula de fibrinogênio ao receptor IIb/IIIa permite a ampliação do processo de adesividade entre as plaquetas e a conseqüente formação do trombo (GOMES et al., 2004).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Estudo da estrutura química dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso biossintetizados pelas algas vermelhas *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Gracilariaceae) e *Agardhiella ramosissima* (Harv.) Kylin (Gigartinales, Solieriaceae), e avaliação as propriedades anticoagulantes e do potencial de inibição à agregação plaquetária desses polissacarídeos.

2.2. Objetivos específicos

- Extração, fracionamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados;
- Determinação da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC);
- Determinação da estrutura química fina por métodos químicos e espectroscópicos dos principais polissacarídeos homogêneos;
- Avaliação das atividades anticoagulantes dos polissacarídeos solúveis medidas pelo teste do APTT (tempo de ativação da tromboplasrina) e TT (Tempo de Trombina);
- Avaliação do efeito dos polissacarídeos solúveis na agregação de plaquetas humanas “in vitro”.

Parte 2

Estudos Químicos e Estruturais dos Polissacarídeos Sulfatados da Alga Marinha Vermelha *Gracilaria cornea*

Sumário

3. Materiais e Métodos
4. Resultados e Discussão

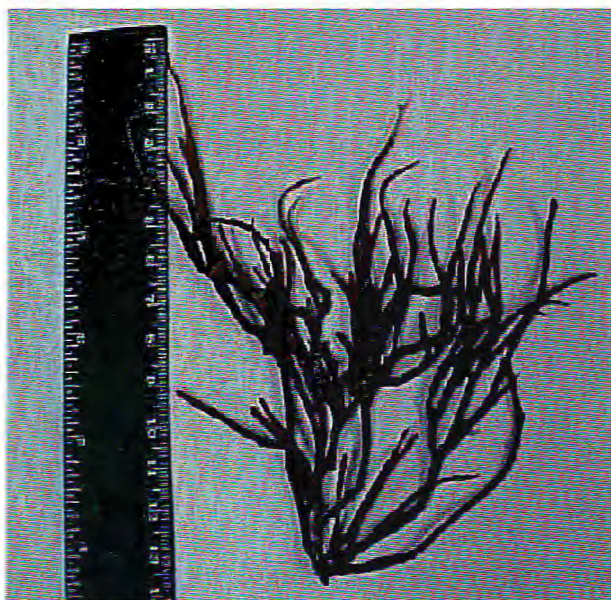
3. Materiais e Métodos

3.1. ALGA MARINHA – COLETA E PROCESSAMENTO

A alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* (FIGURA 3.1) foi coletada junto ao substrato arenoso em mesolitoral na praia de Fleixeiras, Trairi-CE, em ocasião de maré de sizígia. Após a coleta, a alga foi lavada com água doce, livre de epífitas e estocada a -20 °C para posterior utilização.

O processamento de extração dos polissacarídeos iniciou-se com o descongelamento da alga (aproximadamente 380 g de alga fresca), secagem ao sol ou em estufa a 25-30 °C, moagem em moinho de faca (WILLEY MILL) para a obtenção do pó seco (69,5 g), o qual foi submetido a extrações seriadas.

A alga foi classificada pela Pesquisadora Norma Pinheiro Dantas do Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR da Universidade Federal do Ceará. Uma exsicata desta espécie foi depositada no Herbário Prisco Bezerra - EAC do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob o número 34.739.



Classificação:

Divisão - Rhodophyta

Ordem - Gracilariales

Família - Gracilariaceae

Gênero - *Gracilaria*

Espécie - *Gracilaria cornea*

FIGURA 3.1. Fotografia da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh.

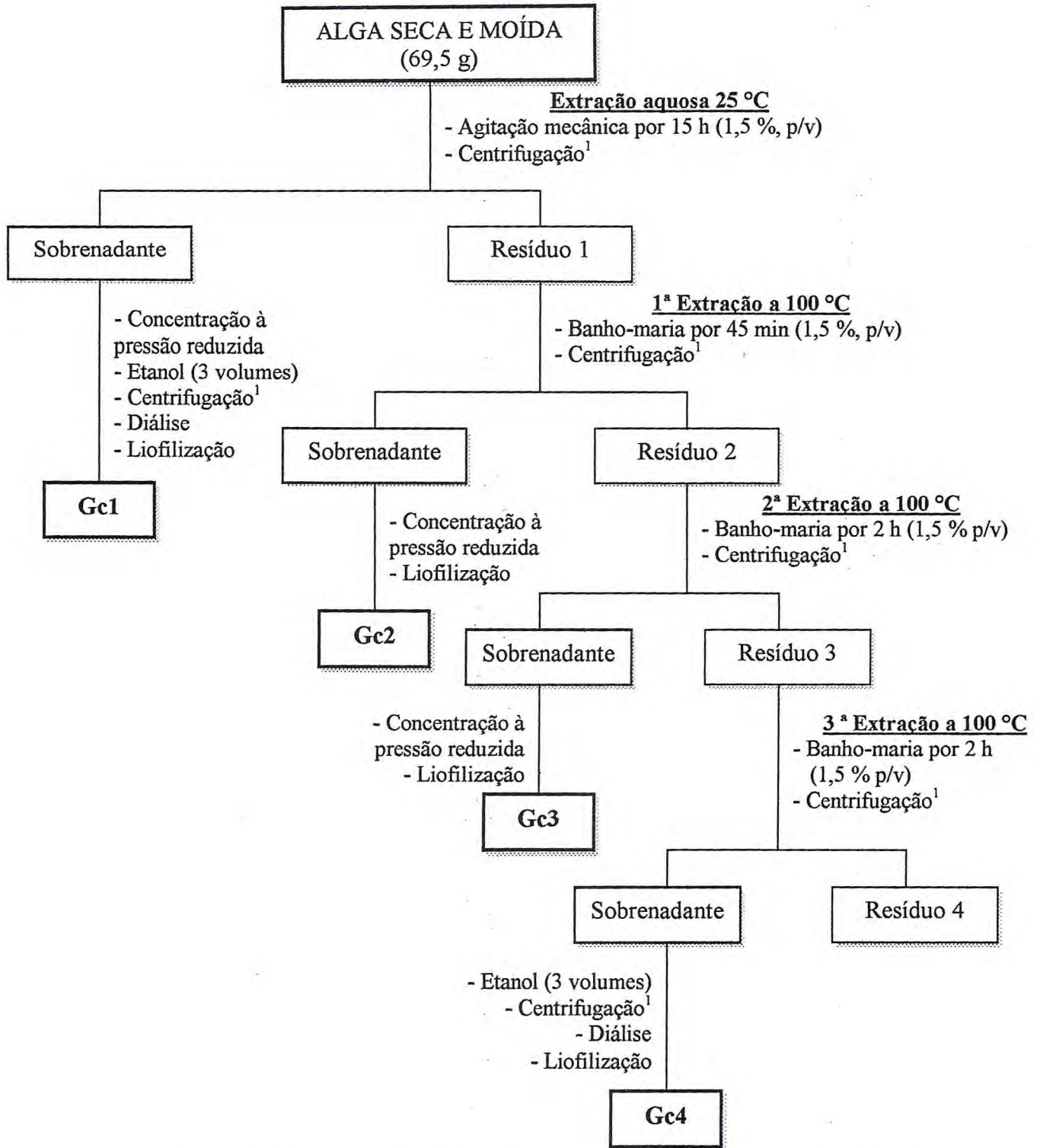
3.2. REAGENTES

Complexo borane-4-metil morfolina 97 %, DEAE-Sephadex, nitrato de prata, Albumina Sérica Bovina e os Padrões de açúcares foram obtidos da Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA. Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3.3. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As algas secas e moídas foram submetidas à extração aquosa (1,5 % p/v) sob agitação mecânica, à temperatura de 25 °C por quinze horas. Após essa etapa, o extrato aquoso foi centrifugado a 17.000 x g por 10 min, e o sobrenadante concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida (rotaevaporador). Em seguida foi adicionado etanol (3:1) para precipitação dos polissacarídeos. O precipitado foi separado por centrifugação, ressolubilizado em água, dialisado contra água destilada e liofilizado. Essa fração obtida a partir da primeira extração a frio foi denominada de Gc1 (ESQUEMA 3.1).

Os resíduos das algas foram seqüencialmente submetidos a extrações aquosas a 100 °C em banho-maria, sob agitação mecânica, durante 45 min (primeira extração a quente) e 2 horas (segunda e terceira extração a quente). Após cada etapa, os extratos aquosos foram centrifugados a 17.000 x g por 10 min. Os sobrenadantes da primeira e segunda extração a quente por serem extremamente gelatinosos, foram diretamente submetidos à redução de volume (rotaevaporador) e liofilizados. O sobrenadante da terceira extração a quente, menos viscoso que os sobrenadantes das duas extrações a quente anteriores, foi precipitado com etanol (3:1), centrifugado a 17.000 x g por 10 min. O precipitado foi separado por centrifugação, ressolubilizado em água, dialisado contra água destilada e liofilizado. As frações brutas Gc2, Gc3 e Gc4 correspondem à primeira, segunda e terceira extração a quente, respectivamente (ESQUEMA 3.1).



ESQUEMA 3.1. Extração aquosa dos polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria cornea*, a 25 °C e 100 °C.

1 = centrifugação por 10 min, 17.000 x g a 20 °C.

3.4. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. cornea* POR SOLUBILIZAÇÃO AQUOSA

As frações brutas Gc2, Gc3 e Gc4 a 0,2 % foram solubilizadas em água destilada, deixando-se sob agitação à temperatura ambiente por 15 horas. Posteriormente as suspensões foram submetidas à centrifugação (15.200 x g, 20°C, 20 min). Os sobrenadantes foram então liofilizados originando as frações Gc2S, Gc3S e Gc4S, respectivamente.

3.5. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. cornea* POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA

A fração Gc2S (0,1 g) foi submetida a fracionamento através de cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-Sephacel, utilizando-se como eluentes água e concentrações crescentes de cloreto de sódio. De acordo com a eluição, a subfração Gc2S-w não foi retida na coluna, sendo eluída com água destilada. As subfrações seguintes retidas na coluna foram eluídas com NaCl nas concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75 M, originando as subfrações Gc2S-a, Gc2S-b e Gc2S-c, respectivamente.

As eluições foram monitoradas pela determinação do conteúdo de açúcar total pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

3.6. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.6.1. Dosagem de sulfato

O teor de sulfato foi determinado segundo DODGSON (1961), tendo como reagente a mistura gelatina-bário. Após hidrólise das amostras com HCl 1 M, por 5 horas, a 105 °C, os reativos (TCA 3 %, mistura gelatina-bário) foram adicionados. Nesse método, o sulfato complexiona com o bário, formando sulfato de bário (sal insolúvel), sendo que a

gelatina está presente para manter em suspensão, ou aumentar o tempo de sedimentação do sal formado. A sensibilidade do método está na faixa de 20 – 200 µg de sulfato, a leitura da absorbância foi realizada em 360 nm e utilizou-se como padrão sulfato de sódio na concentração de 1 mg/mL.

3.6.2. Dosagem de proteína

As dosagens de proteínas solúveis nas amostras foram feitas pelo método de LOWRY et al. (1951). A 1 mL da amostra previamente diluída foram adicionados 5 mL do reagente FOLIN C e, após 10 minutos de repouso, adicionado 0,5 mL do reagente FOLIN D. Após repouso de 30 minutos, as absorbâncias foram lidas a 750 nm em Espectrofotômetro Spectronic modelo 20 GENESYS. A concentração de proteínas foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

3.6.3. Dosagem de carboidrato

O teor de carboidrato nas frações foi determinado utilizando-se a técnica de DUBOIS et al. (1956). A 1 mL da amostra previamente diluída foram adicionados 1 mL de fenol a 5 % e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e, após agitação, a mistura permaneceu em repouso por 15 minutos para então ser feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 490 nm. A concentração de carboidratos foi estimada com relação a uma curva padrão previamente estabelecida utilizando-se galactose.

3.6.4. Rotação óptica específica

A determinação da rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20}$ foi realizada em polarímetro PERKIN ELMER, modelo 341, a 20 °C, utilizando amostras na concentração de 0,2 % em água destilada.

3.7. HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL

Para determinação da composição monossacarídica das frações obtidas a partir da alga vermelha *G. cornea*, utilizou-se hidrólise reductiva de acordo com a metodologia descrita por Stevenson e Furneaux (1991).

Neste método, a hidrólise é realizada com ácido trifluoroacético (TFA) 3 M na presença do complexo borane-4-metil morfolina, um agente redutor estável em meio ácido, à temperatura de 80 °C por 15 minutos, com a finalidade de reduzir as unidades de 3,6-anidro- α -galactopiranosose logo após sua liberação do polímero, protegendo-as da degradação e possibilitando sua quantificação, juntamente com outros monossacarídeos constituintes da molécula. Em uma segunda etapa, a concentração de TFA é ajustada para 2 M pela adição da solução do complexo borane-4-metil morfolina, à temperatura de 120 °C, por 90 minutos, havendo hidrólise das ligações glicosídicas envolvendo as demais unidades constituintes do polissacarídeo, as quais serão também reduzidas.

Após liofilização do hidrolisado, os monossacarídeos foram acetilados (anidrido acético/TFA concentrado, a 50 °C por 15 minutos) e analisados na forma de acetatos de alditóis por cromatografia líquido-gasosa (CLG) e/ou cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CLG-EM).

3.8. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

As frações que apresentavam derivados 3-*O*- e/ou 4-*O*-metil-galactose foram submetidas à hidrólise ácida total (ácido fórmico 45 %, a 100 °C por 16 horas). Após eliminação do ácido por codestilação, o hidrolisado foi reduzido com boroidreto deuterado (NaBD₄) por 12 horas e acetilado com anidrido acético 0,4 %, a 120 °C por 1,5 h. Os acetatos de alditóis foram analisados por CLG-EM com o objetivo de diferenciar os derivados simétricos 3-*O*- e 4-*O*-metil-galactose.

3.9. DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

3.9.1. Preparo do sal de piridônio

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio. Para formação deste sal, as frações Gc2 e Gc2S foram solubilizadas em água e então adicionou-se resina catiônica DOWEX 50X8 na forma H^+ , sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. O pH do sobrenadante ficou entre 1 – 2. Os filtrados (obtidos por filtração à pressão reduzida) foram neutralizados (em capela) com piridina, a pH 7,0 e liofilizados (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

3.9.2. Solvólise

A fração Gc2S, na forma de sal de piridônio, foi solubilizada em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, cuja proporção foi de 89:10:1, respectivamente, respeitando-se a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL da mistura (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

A solução resultante foi mantida a 100 °C, durante 4 horas. Após o resfriamento, a fração solvolisada foi submetida à diálise exaustiva contra água destilada e liofilizada. O polissacarídeo dessulfatado foi analisado quanto ao seu teor de sulfato.

3.9.3. Curva de dessulfatação

A fração Gc-2, na forma de sal de piridônio, foi solubilizada em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, na proporção de 89:10:1, respectivamente, respeitando-se a relação 10 mg para 3 mL da mistura.

Para verificar o melhor tempo de hidrólise, a solução resultante foi separada em 4 alíquotas de 6 mL, deixadas a 100 °C na estufa com tempos de 4, 6, 8 e 10 horas. Após resfriamento as frações foram submetidas à diálise exaustiva contra água destilada e liofilizadas. O polissacarídeo dessulfatado foi analisado quanto ao seu teor de sulfato.

3.10. TRATAMENTO ALCALINO

3.10.1. Analítico

Este tratamento foi realizado com a finalidade de quantificar o teor de unidades precursoras de 3,6-anidrogactose através do método fotocolorimétrico do resorcinol. A fração Gc2S foi solubilizada em água destilada (0,2 %) e reduzida com NaBH₄ (10 % em massa) por 16 horas. Em banho de gelo, foi adicionado a esta solução hidróxido de sódio 3 M (2,5 mL), até concentração final de 1 M e NaBH₄ (5 % em massa). Aliquotas de 0,5 mL da solução foram mantidas a 80 °C em banho termostatizado e retiradas uma a uma em diferentes tempos (NOSEDA; CERREZO, 1995). Este tratamento também foi realizado a 70 e 60 °C.

3.10.2. Semi-preparativo

Este tratamento foi realizado com a finalidade de se obter frações quimicamente modificadas. A fração polissacarídica Gc2S foi solubilizada em água destilada (0,2 %) e reduzida com boroidreto de sódio (NaBH₄ – 10 % em massa do polissacarídeo) por 16 horas, a ela foi então adicionado hidróxido de sódio 3 M (0,4 %), concentração final 1 M e novamente NaBH₄ (5% em massa). A solução foi mantida à temperatura de 80 °C em banho termostatizado por 3 horas e 30 minutos (NOSEDA; CERREZO, 1995), sendo em seguida neutralizada com ácido clorídrico fumegante, dialisada e liofilizada, com obtenção da fração Gc2S-TA.

3.10.3. Estudo cinético da reação de ciclização

O estudo cinético da reação de ciclização foi realizado através do acompanhamento da reação de ciclização pela determinação do teor em 3,6-anidrogactose pelo método do resorcinol. Com estes resultados foi possível calcular a constante de velocidade (k) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da reação.

3.11. METILAÇÃO

3.11.1. Preparo do sal de trietilamônio

As galactanas Gc2S e Gc2S-TA foram convertidas em seus correspondentes sais de trietilamônio por diálise seqüencial contra trietilamina (1 %; 6 h; 3 vezes) e água destilada (2 horas; 3 vezes). Os polissacarídeos foram recuperados na forma de sal de trietilamônio e liofilizados (STEVENSON; FURNEAUX, 1991).

3.11.2. Metilação

Após liofilização, os polissacarídeos solúveis em DMSO foram metilados pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Os polissacarídeos, na forma de sal de trietilamônio (50 mg de Gc2S e 20 mg de Gc2S-TA), foram dissolvidos em DMSO (3,4 mL para Gc2S e 2,0 mL para Gc2S-TA) sob agitação magnética. Hidróxido de sódio pulverizado (200 mg para Gc2S e 80 mg para Gc2S-TA) foi adicionado, e as misturas foram mantidas sob agitação por 20 minutos à temperatura ambiente. Iodeto de metila (0,4 mL para Gc2S e 0,15 mL para Gc2S-TA) foi adicionado, e o sistema mantido sob agitação magnética por 30 minutos a 25 °C. A adição dos reagentes foi repetida por mais 2 vezes. Após adição de água (1 mL), neutralização com ácido acético P.A., diálise contra água destilada e liofilização, foram obtidos os polissacarídeos permetilados. Estes foram submetidos à hidrólise redutiva (STEVENSON; FURNEAUX, 1991) e analisados por CLG e/ou CLG-EM na forma de acetatos de alditois.

3.12. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.12.1. 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 d.i.), revestida com DB-225 (0,25 µm) em diferentes temperaturas: as análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas a 220 °C e as amostras de acetatos de alditóis parcialmente metilados a 210 °C.

3.12.2. Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CLG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massa, foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa da marca VARIAN – SATURN 2000R, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225 da marca J.W. As injeções na coluna foram feitas mantendo-se a temperatura inicial de 50 °C, seguido de aumento gradual de 40 °C por minuto, até 225 °C, mantendo-se constante a partir deste valor. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1,5 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, na faixa de m/z (relação carga/massa) 80 a 220. Este método foi utilizado para a quantificação 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) e da comparação com padrões.

3.12.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A distribuição das massas molares foi estimada através de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), usando-se um equipamento SHIMADZU, com detectores de índice de refração e UV-visível a 254 nm.

Uma coluna ULTRAHYDROGEL de 7,8 x 300 mm, com fase móvel NaNO₃ 0,1 M, fluxo de 0,5 mL/min e limite de exclusão entre 10⁶ e 10³ g/mol foi utilizada. Amostras de 3 mg de carboidrato foram dissolvidas em 1 mL de NaNO₃ 0,1 M. O volume injetado das amostras e dos padrões foi de 50 µL. Para construção da curva de calibração foram utilizadas pululanas de diferentes massas molares.

3.13. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.13.1. Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ¹³C)

As amostras Gc1, Gc2, Gc3, Gc2S-D e ArS submetidas às análises de ressonância magnética nuclear (RMN) monodimensionais conduzidas no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, foram realizadas em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance.

As amostras Gc2S, Gc2S-TA, ArK-b e ArK-c submetidas às análises de RMN monodimensionais conduzidas no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, foram realizadas em espectroscópio de BRUKER, modelo AVANCE-DRX- 500.

As amostras foram dissolvidas em água deuterada (D₂O - aproximadamente 30 mg.mL⁻¹) e colocadas em tubos de diâmetro externo de 5 mm. As análises foram realizadas a 70 °C, por 12 horas.

Os deslocamentos químicos expressos em δ (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno para as análises de ¹³C (δ=31,07 ppm).

3.13.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de fourier (FT-IR)

Com as frações de carboidratos sulfatados obtidas, foram registrados espectros na região do infravermelho em Espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 100, em pastilha de KBr, na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

4. Resultados e Discussão

4.1. OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *Gracilaria cornea*

4.1.1. Extração e análise química

A alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*, pertencente à ordem Gracilariales, foi submetida à extração aquosa a 25 °C por 15 horas. Após centrifugação, o sobrenadante aquoso foi concentrado parcialmente à pressão reduzida e tratado com etanol (3:1 v/v) para precipitação dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso. Após diálise e liofilização, a fração bruta obtida foi denominada Gc1, representando 7,2 % da alga seca (ESQUEMA 3.1 na pág 63, TABELA 4.1).

Continuamente, a alga residual (Resíduo 1) foi submetida à extração aquosa à temperatura de 100 °C (3 vezes). Os extratos obtidos a partir da 1ª e 2ª extração à quente foram centrifugados, concentrados parcialmente à pressão reduzida, liofilizados e denominados Gc2 e Gc3, representando 26,2 % e 18,8 % de rendimento, respectivamente. Essas frações não foram submetidas ao tratamento com etanol, devido já formar um sobrenadante aquoso bastante gelatinoso após centrifugação. A fração obtida a partir da 3ª extração à quente foi precipitada com etanol (3:1) e centrifugada. O respectivo precipitado após diálise e liofilização foi denominado de Gc4 e apresentou 10,5 % de rendimento (ESQUEMA 3.1 na pág 63, TABELA 4.1).

Os dados da TABELA 4.1 indicam que a fração Gc2, oriunda da primeira extração a quente, teve o maior rendimento (26,2 %), enquanto que a fração Gc1, obtida da primeira extração a frio, foi responsável pelo menor rendimento (7,2 %) do peso seco da farinha da alga. A fração Gc1 também apresentou alto conteúdo de sulfato (37,4 %), provavelmente devido aos sais do meio, removidos nessa primeira etapa de extração, e conseqüente, baixo teor de carboidrato (40,0 %). Por esta razão, a fração Gc1 foi submetida a uma nova precipitação com etanol, originando a fração Gc1rep, e depois de novas dosagens, foi observada uma redução no teor de sulfato para 17,2 %, seguido de um aumento nos teores de carboidrato e proteína (56,6 e 8,6 %, respectivamente).

TABELA 4.1. Rendimento e análise química das frações polissacarídicas de *G. cornea*, após extração aquosa nas temperaturas de 25 e 100 °C.

Fração ^a	Massa (g)	Rendimento ^b (%)	Carboidrato (%)	Sulfato NaSO ₃ (%)	Proteína (%)
Gc1	5,0	7,2	40,0	37,4	2,4
Gc1rep	1,0	1,4	56,6	17,2	8,6
Gc2	18,2	26,2	84,6	8,6	2,4
Gc3	13,1	18,8	88,8	7,8	2,1
Gc4	7,3	10,5	89,0	8,3	-

a = Gc1 fração obtida da extração aquosa a 25 °C; Gc1rep fração obtida a partir de Gc1 reprecipitada em etanol; Gc2 fração obtida da extração à temperatura de 100 °C; Gc3 fração obtida da segunda extração à temperatura de 100 °C e Gc4 fração obtida da terceira extração à temperatura de 100 °C.

b = rendimento expresso em termos da alga seca e moída (69,5 g).

- = não detectado.

Como mostra a TABELA 4.1, as frações Gc2, Gc3 e Gc4 apresentaram teores de sulfato variando de 7,8 a 8,6 %, superiores aos encontrados na literatura para outras espécies tropicais de *Gracilaria* (COTE; HANISAK, 1986; FREILE-PELEGRÍN; MURANO, 2005; MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005), até mesmo para *Gracilaria cornea* coletada no México, que apresentou variações de 4,8 a 5,47 % nas estações de seca e de chuva, respectivamente (FREILE-PELEGRIN; ROBLEDO, 1997). Todavia, Mazumder et al. (2002) encontraram teores de sulfato variando de 2,1 a 11,7 % para frações de *G. corticata*, e os teores mais elevados também foram atribuídos a frações obtidas a frio.

Com exceção da fração Gc4, que não apresentou proteína, e Gc1rep que apresentou altos teores de proteína (8,6 %), as frações Gc2 e Gc3 apresentaram baixos teores de proteína, variando de 2,4 a 2,1 % (TABELA 4.1). Estes dados estão de acordo com teores protéicos encontrados para os polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria cornea* (variando de 2,6 a 3,0 %) extraídos após hidrólise proteolítica seguida de precipitação dos polissacarídeos sulfatados com CPC (MELO et al., 2002). A obtenção de frações polissacarídicas extraídas a frio com altos teores protéicos também foram observadas para outros gêneros de algas vermelhas tais como: *Gymnogongrus griffithsiae*, com teores protéicos variando de 23,4 a 11,0 % (FARIA, 2002), *Amansia multifida*, com teores

variando de 60,0 a 56,0 % e *Osmundaria obtusiloba*, com teores protéicos variando de 29,8 a 24,2 % (CASSOLATO, 2004).

O rendimento total em polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *Gracilaria cornea* observado na TABELA 4.1, levando em consideração o rendimento da fração Gc1rep (1,4 %), foi de aproximadamente 57,0 %. Esses valores estão bem acima dos rendimentos encontrados para outras espécies de *Gracilaria* como pode ser visto na TABELA 4.2.

TABELA 4.2. Rendimentos de ágar de espécies de *Gracilaria*.

Espécie	Localidade	Rendimento (%)	Fonte
<i>G. bursa-pastoris</i>	França	34,8 ^a	Marinho-Soriano (2001)
<i>G. cervicornis</i>	México (Yucatan)	39,3 ^b	Freile-Pelegrín e Murano (2005)
<i>G. cervicornis</i>	Brasil (RN)	11 – 20 ^c	Marinho-Soriano, Silva e Moreira (2001)
<i>G. cornea</i>	Brasil (CE)	56,9^d	Este trabalho
<i>G. cornea</i>	Brasil (CE)	21,4 ^e	Melo et al. (2002)
<i>Hydropuntia cornea</i> (= <i>G. cornea</i>)	Brasil (RN)	29 – 41 ^f	Marinho-Soriano, Silva e Moreira (2001)
<i>G. cornea</i>	Yucatan	35,6– 42,1 ^g	Freile-Pelegrín e Robledo (1997)
<i>G. dura</i>	França	32 – 35 ^h	Marinho-Soriano e Bourret (2005)
<i>G. verrucosa</i>	Turquia	24 – 43 ⁱ	Yenigül (1993)
<i>G. gracilis</i> (= <i>G. verrucosa</i>)	França	11,1 – 18,7 ^j	Mollet, Rahaoui e Lemoine (1998)

a = autoclavagem seguida de congelamento/degelo.

b = extração aquosa à quente.

c = extração aquosa à quente. Máx e Min na estação seca.

d = extrações aquosas seqüenciais.

e = digestão enzimática seguida de tratamento com CPC.

f = extração aquosa à quente. Máx e Min na estação chuvosa.

g = extração aquosa à quente. Máx na estação chuvosa. Min no inverno.

h = autoclavagem seguida de congelamento/degelo. Máx mês de outubro. Min no mês de junho.

i = tratamento com amilase e precipitação com álcool isopropílico.

j = autoclavagem seguida de congelamento/degelo, e precipitação com etanol 95 %. Máx mês de março. Min mês de abril.

Segundo Armisen (1995), em geral o rendimento de ágar de espécies de *Gracilaria* é muito variável. Vários fatores, tais como: condições ambientais, variação sazonal (FREILE-PELEGRÍN; MURANO, 2005; MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998), fatores fisiológicos (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005; MARINHO-SORIANO; SILVA; MOREIRA, 2001) e métodos de extração (FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 1997; MARINHO-SORIANO; SILVA; MOREIRA, 2001; VILLANUEVA; PAGBA; MONTAÑO, 1997) afetam o rendimento e a relativa proporção dos constituintes do ágar.

Estudos prévios de agarófitas têm mostrado que a variação sazonal de biomassa e rendimento de ágar pode ou não exibir um padrão similar (MARINHO-SORIANO; SILVA; MOREIRA, 2001).

Como mostrado na TABELA 4.2, na *G. verrucosa* da Turquia, o pico de rendimento de ágar foi observado durante o verão e o mínimo no inverno (YENIGÜL, 1993). Para *G. dura* da França, o maior rendimento foi observado no outono e o menor no verão (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005), e ainda, para *G. cervicornis* coletada no Brasil foi observado máximo e mínimo de rendimento, na estação de seca e para *H. cornea* (= *G. cornea*), também do Brasil, foi observado máximo e mínimo de rendimento de ágar na estação chuvosa (MARINHO-SORIANO; SILVA; MOREIRA, 2001).

Comparando o rendimento de 21,4 % obtido para *G. cornea* coletada no Brasil (CE - MELO et al., 2002), onde foi utilizado somente uma etapa de extração, com o rendimento de ágar obtido no presente estudo para a mesma espécie de alga (56,9 %), coletada na mesma região, com a utilização de etapas de extrações aquosas seqüenciais, e desconsiderando os fatores sazonais, é possível sugerir que o protocolo de extração adotado foi um fator determinante no rendimento dos polissacarídeos extraídos, visto que a extração aquosa, possibilita uma extração exaustiva, reduzindo quase completamente o resíduo a um material fibroso insolúvel em meio aquoso.

4.1.2. Composição monossacarídica

As análises das composições monossacarídicas das galactanas obtidas de *G. cornea* realizadas pelo processo de hidrólise reductiva (STEVENSON; FURNEAUX, 1991) são apresentadas na TABELA 4.3. Este processo ocorre em duas etapas devido a maior labilidade das ligações glicosídicas das unidades de 3,6-anidrogactose:

Deste modo podem ser quantificadas conjuntamente por análise de CLG, as unidades de anidrogactose (3,6-anidrogactose) e as outras unidades monossacarídicas.

TABELA 4.3. Composição monossacarídica das frações da alga vermelha *Gracilaria cornea*.

Frações ^b	Monossacarídeos (mol %) ^a					
	3,6 AnGal ¹	Xil ²	6MeGal ³	3 e 4MeGal ⁴	Gal ⁵	Glc ⁶
Gc1	25,9	1,7	5,4	1,2	62,3	3,5
Gc2	37,8	2,0	9,9	tr.	50,3	tr.
Gc3	38,4	tr.	10,4	tr.	49,5	1,7
Gc4	50,3	-	6,3	-	39,3	4,1

a = na forma de acetato de alditóis, por CLG (STEVENSON; FURNEAUX, 1991).

b = frações obtidas por extração aquosa a 25 °C (Gc1) e a 100 °C (Gc2, Gc3 e Gc4).

1, 2, 3, 4, 5 e 6 = abreviatura dos monossacarídeos (3,6AnGal = 3,6-anidrogactose; Xil = xilose; 6MeGal = 6-*O*-metilgactose; 3 e 4MeGal = 3-*O*-metilgactose e 4-*O*-metilgactose; Gal = gactose e Glc = gucose).

- = não detectado.

tr. = traços (< 1 mol %).

Pelos dados de composição monossacarídica das frações da alga *G. cornea* apresentados na TABELA 4.3, pode-se constatar que ela sintetiza uma gactana, devido seu alto conteúdo de gactose (39,3 – 62,3 moles %) e de seus derivados naturalmente metilados: 6-*O*-metil-gactose (5,4 – 10,4 moles %) e em menor quantidade 3-*O*- e 4-*O*-metilgactose (traços – 1,2 moles %). O polímero ainda apresenta alto conteúdo de 3,6-anidrogactose (25,9 – 50,3 moles %), baixa quantidade de xilose (traços – 2,0 moles %), além de apresentar pequena contaminação por gucose (traços – 4,1 moles %), oriunda do

carboidrato de reserva das algas vermelhas denominado amido das florídeas, uma glucana de ligações α -(1→4) e pontos de ramificações no carbono 6 com ligações do tipo α (1→6) (PAINTER, 1983).

A presença de galactose e 3,6-anidrogactose como monossacarídeos majoritários já foi observada em várias outras algas da ordem Gracilariales (CRAIGIE; WEN; VAN DER MEER, 1984; MELO et al., 2002; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998), e suas quantidades são geralmente variáveis.

A substituição por grupos sulfato e metil, já foi também observada por Quemener e Lahaye (1998) para as algas *G. tikvahiae* e *G. eucheumoides*. A primeira é constituída principalmente por 6-*O*-metil-L-galactose (30,4 moles %) e 3,6-anidrogactose (36,3 moles %), enquanto que para a segunda, galactose (40,4 moles %) e 2-*O*-metil-3,6-anidrogactose (36,6 moles %) são os principais monossacarídeos componentes.

Experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C para a alga *G. edulis* submetida ao tratamento alcalino revelaram que o polissacarídeo sintetizado era constituído principalmente por unidades repetitivas de 6-*O*-metil- β -D-galactopiranosose ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. Metoxilação parcial em C-2 das unidades de anidrogactose e sulfatação parcial em C-4 das unidades de 6-*O*-metil- β -D-galactopiranosose também foram reveladas como demonstrado pelas análises de RMN e FT-IR. Embora esse padrão de sulfatação seja característico para a família κ -carragenana e não para agaranas (VILLANUEVA; MONTAÑO, 1999), algumas agaranas podem apresentar grande parte das unidades "A" 4-sulfatadas como a isolada de *Bostrychia montagnei* (Ceramiales) que além de sulfato em C-4 da unidade β -D-galactopiranosose, também apresenta parcial sulfatação em C-6 e C-2 da mesma unidade (DUARTE et al., 2002).

A galactana obtida de *G. cornea* do Brasil (MELO et al., 2002) também se mostrou composta principalmente por galactose (64,6 moles %) e 3,6-anidrogactose (24,7 moles %), além de baixas percentagens de 6-*O*-metilgalactose (8,5 moles %) e glucose (1,5 mol %). Esses valores são similares aos encontrados para as frações obtidas neste estudo para a mesma espécie de alga.

Os polissacarídeos das frações Gc1, Gc2 e Gc3 foram submetidos à hidrólise total e redução com NaBD₄ a fim de definir qual derivado metilado seria sintetizado, se o 3-*O*-metil-galactose e/ou 4-*O*-metil-galactose. Pelos dados de hidrólise total e análise dos

alditóis por GLC-MS, ambos os derivados metilados foram detectados nessas frações em iguais proporções.

4.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A análise por infravermelho é um procedimento rápido que não necessita de um tratamento prévio da amostra, fornecendo muitas informações com a utilização de muito pouco material. Esta técnica é interessante tanto para o meio industrial quanto acadêmico, pois conduz a um rápido levantamento de algas de potencial interesse industrial, para posteriores investigações sobre a química desses polissacarídeos de matrix intercelular (CHOPIN; WHALEN, 1993). A TABELA 4.4 apresenta algumas atribuições de bandas características para polissacarídeos de algas vermelhas.

Segundo Rochas, Lahaye e Yaphe (1986) a banda em 705 cm^{-1} é provavelmente devida ao sulfato em C-4 da galactose, entretanto, fortes absorbâncias em 735 cm^{-1} podem afetar uma determinação acurada na absorbância em 705 cm^{-1} .

Ainda que Mollet, Rahaoui e Lemoine (1998) tenham atribuído a banda em 890 cm^{-1} como específica para ágar, Rochas, Lahaye e Yaphe (1986) observaram as bandas de $900\text{-}895\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de infravermelho tanto de agaranas quanto de carragenanas. Prado-Fernández et al. (2003), por sua vez, atribuíram as absorbâncias nessa região ao C-6 da unidade β -D-galactopiranosose.

A absorbância em 2845 cm^{-1} devida a $O\text{-CH}_3$ ocorreu como um ombro na banda de 2920 cm^{-1} no espectro da agarana altamente metilada de *Gracilaria eucheumoides* (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986).

Estevez, Ciancia e Cerezo (2000) atribuíram o ombro em 972 cm^{-1} , encontrado em algumas frações de *Kappaphycus alvarezzi*, à presença de uma “variante” da iota-carragenana considerada por Craigie (1990) como omicron-carragenana (β -D-galactose-4-sulfato ligada a α -D-galactose-2-sulfato).

TABELA 4.4. Atribuições no espectro de infravermelho para polissacarídeos de algas.

Número de Onda (cm ⁻¹)	Atribuições	Referência
3400 - 3000	v O - H	[5]
2960 - 2920	v CH - (CH ₂ , CH)	[5,6,7]
2850 - 2810	v CH - (O - CH ₃)	[6,7]
1640 - 1615	δ O - H (H ₂ O adsorvida) + v C = O (de amida, proteína)	[6,7]
1530	δ N - H (de amida, proteína)	[3,7]
1380 - 1355	v _{as} S = O (éster sulfato)	[5,6,7]
1250 - 1240	v _{as} S = O (O = S = O)	[1,5,6,7]
1080 - 1040	v C - O + v C - OH (esqueleto de galactana)	[4,5]
972	omicron-carragenana	[1,2]
930	v C - O - C (3,6-anidrogactose)	[1,5,6]
905 - 900	β-D-galactose não sulfatada e/ou 6-O-metilada	[2]
900 - 890	C-6 da unidade β-D-galactose	[6]
850 - 845	C - O - S (galactose-4-sulfato, sulfato axial secundário)	[1,5,6]
830 - 825	C - O - S (galactose-2-sulfato, sulfato equatorial secundário)	[1,5,6]
827 - 820	nu-carragenana	[1]
820 - 810	C - O - S (galactose-6-sulfato, sulfato equatorial primário)	[1,5,6]
805 - 800	C - O - S (3,6-anidrogactose-2-sulfato, sulfato axial secundário)	[1,6]
740	δ C - O - C (ligação glicosídica)	[4,7]
716	δ C - O - C (ligação glicosídica)	[4,7]
705	C - O - S (galactose-4-sulfato, sulfato axial secundário)	[5,6]
615 - 608	δ O = S = O	[5]
580	δ O = S = O	[5]

[1] = CHOPIN; WHALEN, 1993; [2] = ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2000; [3] = LAHAYE; YAPHE, 1989; [4] = MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998; [5] = PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; [6] = ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; [7] = WILLIAMS; FLEMING, 1986.

Os espectros de infravermelho das frações brutas extraídas da *G. cornea* (FIGURAS 4.1 a 4.5) foram muito similares, exceto para a fração Gc1 antes de ser submetida a uma nova precipitação com etanol.

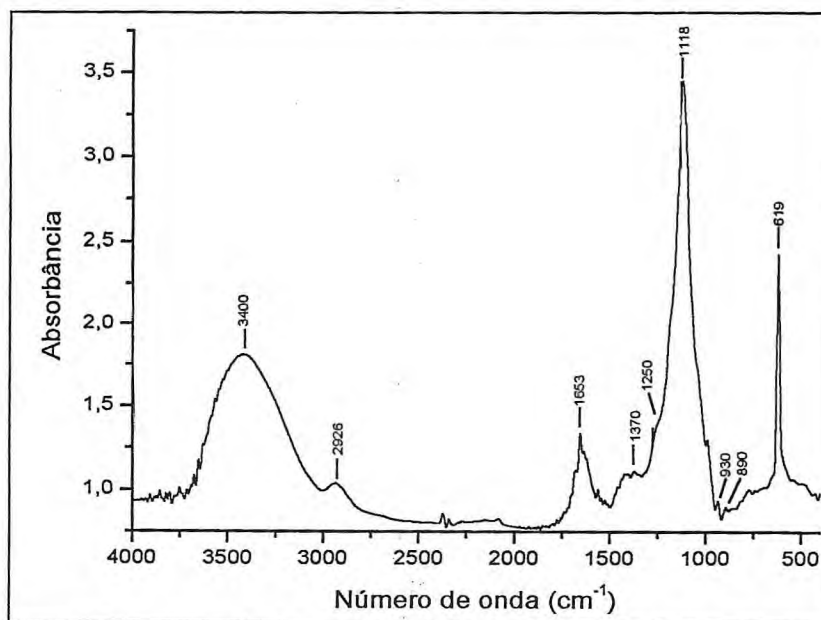


FIGURA 4.1. Espectro na região de infravermelho da fração Gc1, em pastilha de KBr.

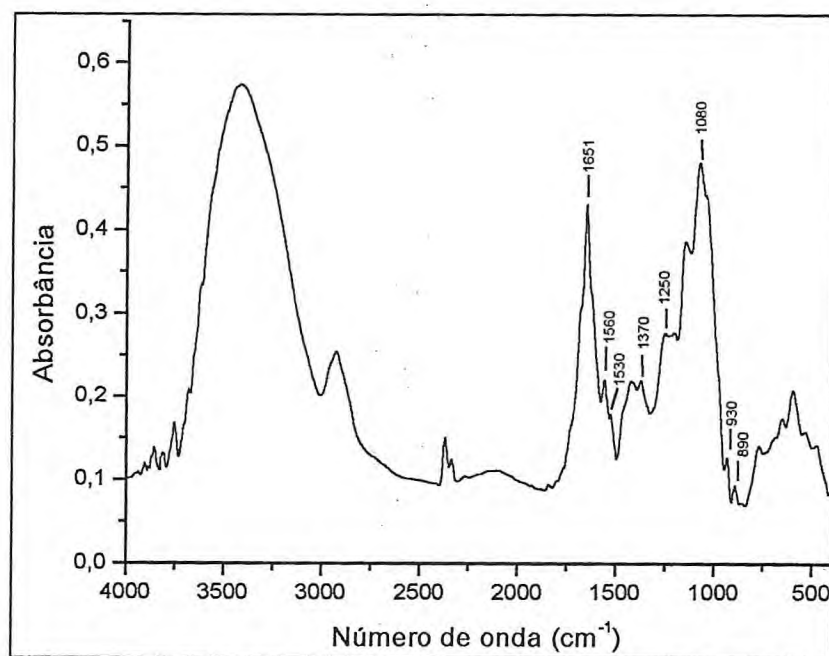


FIGURA 4.2. Espectro na região de infravermelho da fração Gc1rep, em pastilha de KBr.

Pelo espectro de infravermelho da extração Gc1 (FIGURA 4.1) oriunda da extração a frio, pode-se constatar a ausência da banda em 1070 cm^{-1} , referente ao esqueleto de galactanas, e em 1250 cm^{-1} relativa ao sulfato. Também foram observadas bandas muito discretas em 1370 , 930 e 890 cm^{-1} relativas ao éster sulfato, unidade 3,6-anidrogactose e C-6 da unidade β -D-galactose, respectivamente. Esse perfil diferenciado foi corrigido por uma nova precipitação com etanol (FIGURA 4.2), na qual a fração derivada (Gc1rep) apresentou aumento na banda de 3400 cm^{-1} referente a hidroxilas livres e bandas mais definidas em 1370 e 1250 cm^{-1} , correspondentes ao éster sulfato. O espectro de Gc1rep apresentou ainda, banda na região de 1080 cm^{-1} referente ao esqueleto das galactanas e definição um pouco melhor em 930 cm^{-1} (3,6-anidrogactose) e em 890 cm^{-1} (C-6 da β -D-galactose). Dessa forma, a primeira etapa de extração a frio demonstrou extração excessiva de íons, como pode ser visto também na TABELA 4.1 (pág 65), permitindo extrações seguintes menos contaminadas.

Os espectros das frações obtidas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gc2, Gc3 e Gc4) mostrados nas FIGURAS 4.3, 4.4 e 4.5, respectivamente, revelaram relativas semelhanças com relação às bandas obtidas.

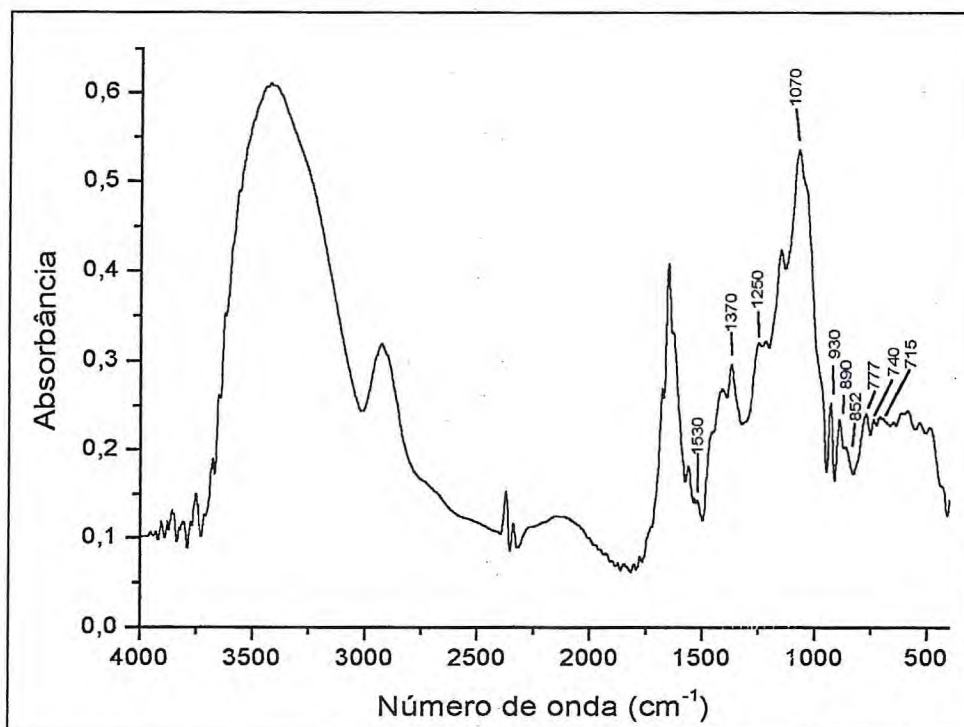


FIGURA 4.3. Espectro na região de infravermelho da fração Gc2, em pastilha de KBr.

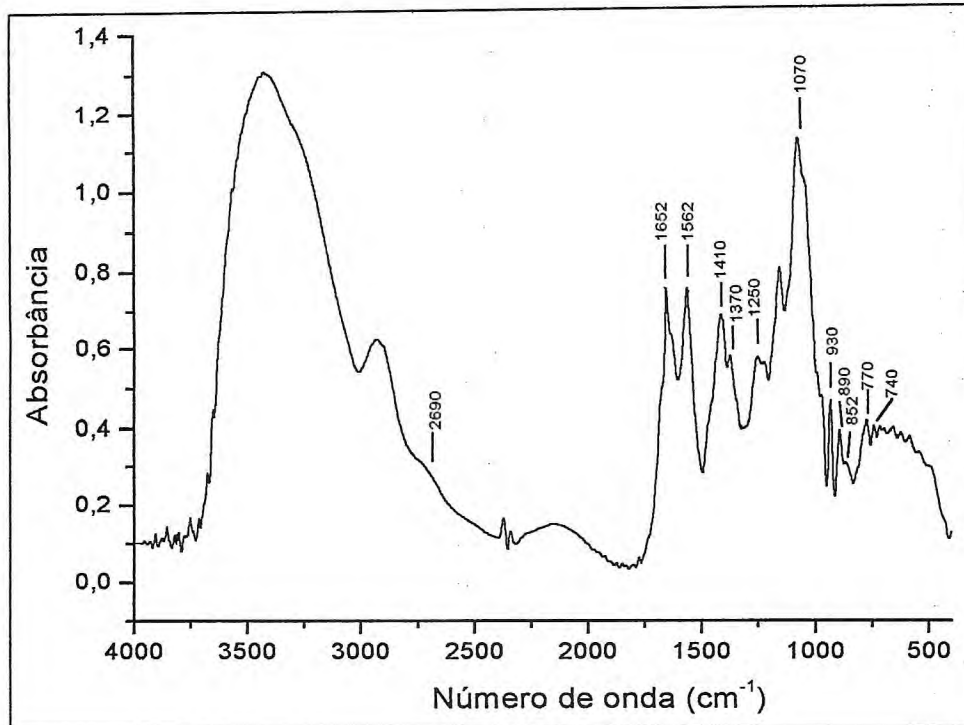


FIGURA 4.4. Espectro na região de infravermelho da fração Gc3, em pastilha de KBr.

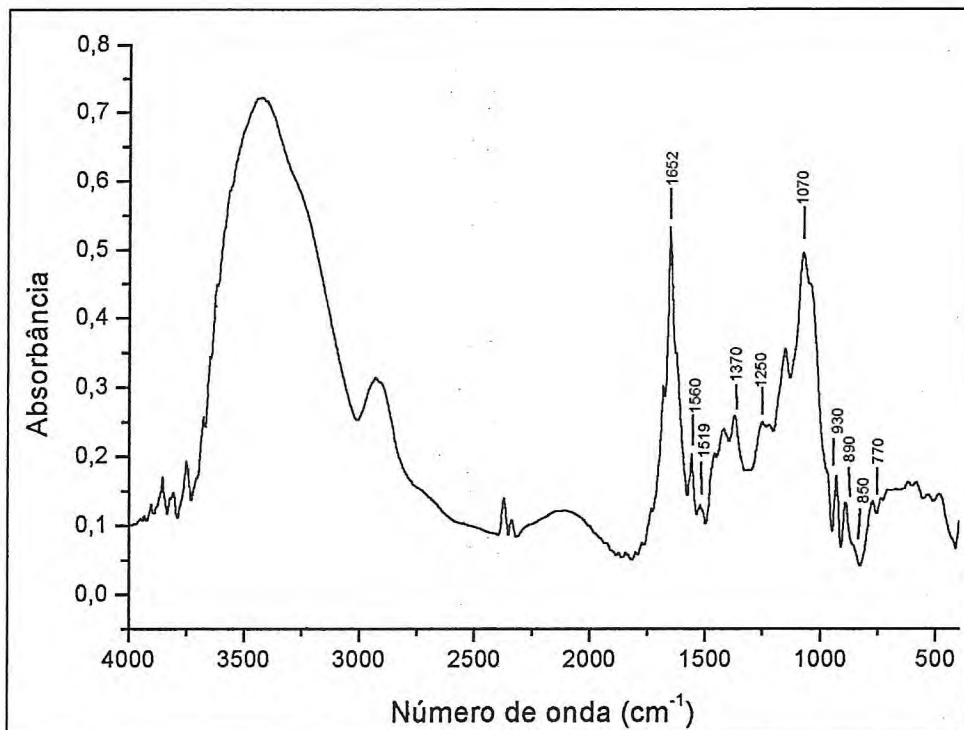


FIGURA 4.5. Espectro na região de infravermelho da fração Gc4, em pastilha de KBr.

As mais importantes bandas foram designadas para 1370 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , correspondendo a éster sulfato, bandas em 1070 cm^{-1} , 930 cm^{-1} e 890 cm^{-1} relativas respectivamente ao esqueleto de galactanas, a vibração da ponte C-O-C da unidade 3,6-anidrogactose e C-6 da β -D-galactose. Um ombro muito discreto, principalmente em Gc2 e Gc3 na região de 850 cm^{-1} , poderia indicar pouca quantidade de sulfato em C-4 da unidade β -D-galactose.

4.1.4. Espectro de RMN de ^{13}C das frações brutas Gc1, Gc2 e Gc3

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações brutas Gc1, Gc2 e Gc3 (FIGURAS 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente) apresentam sinais na região anomérica característicos de β -D-galactopiranosose (102,2 ppm) 6-O-metilada ou não, ligada à 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (98,0 ppm). A presença de unidades anidrogactosídicas com a configuração enantiomérica L- mostra que as galactanas Gc1, Gc2 e Gc3 pertencem ao grupo das agaranas.

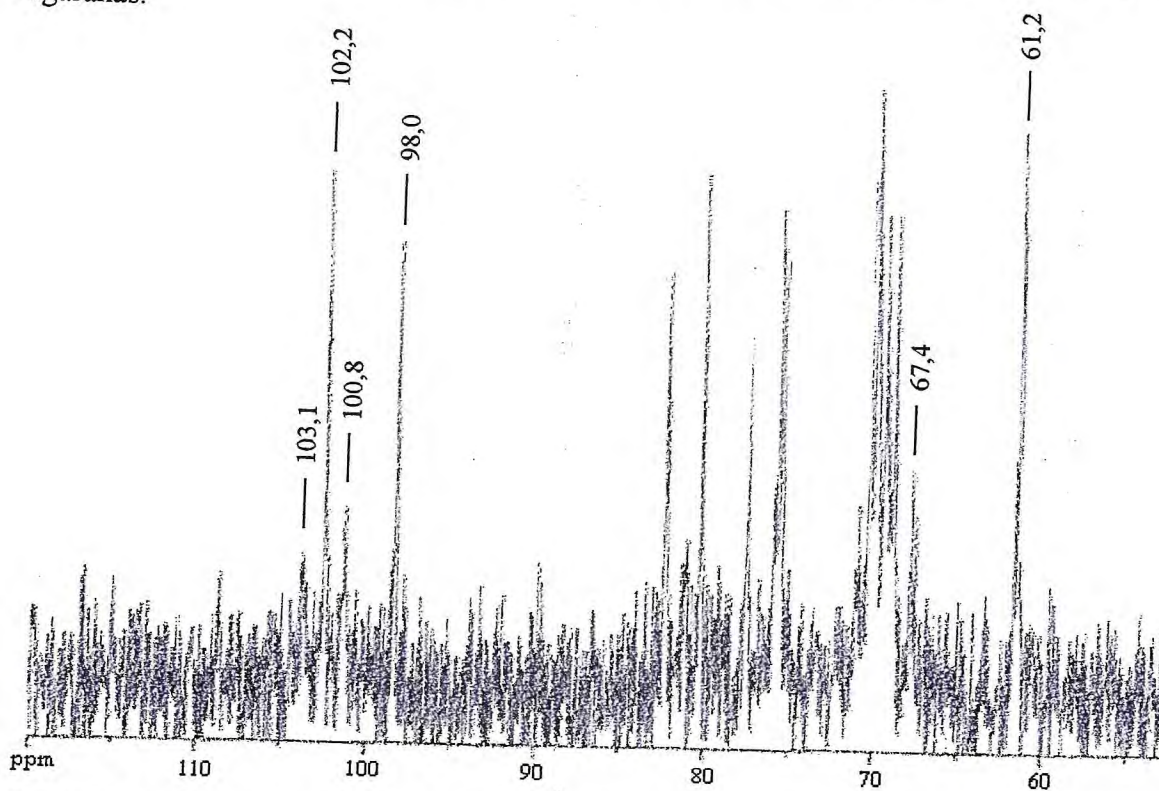


FIGURA 4.6. Espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc1.

Embora os espectros apresentem sinais proeminentes em 61,2 ppm, demonstrando que a maioria das unidades encontram-se não substituídas em C-6, a existência de unidades precursoras (α -galactose-6-sulfato) é sugerida pela presença do sinal em 67,4 ppm, correspondente a unidades sulfatadas em C-6.

Não foi possível observar sinal em 58,7 ppm, referente ao grupo metoxil, provavelmente devido à baixa resolução dos espectros.

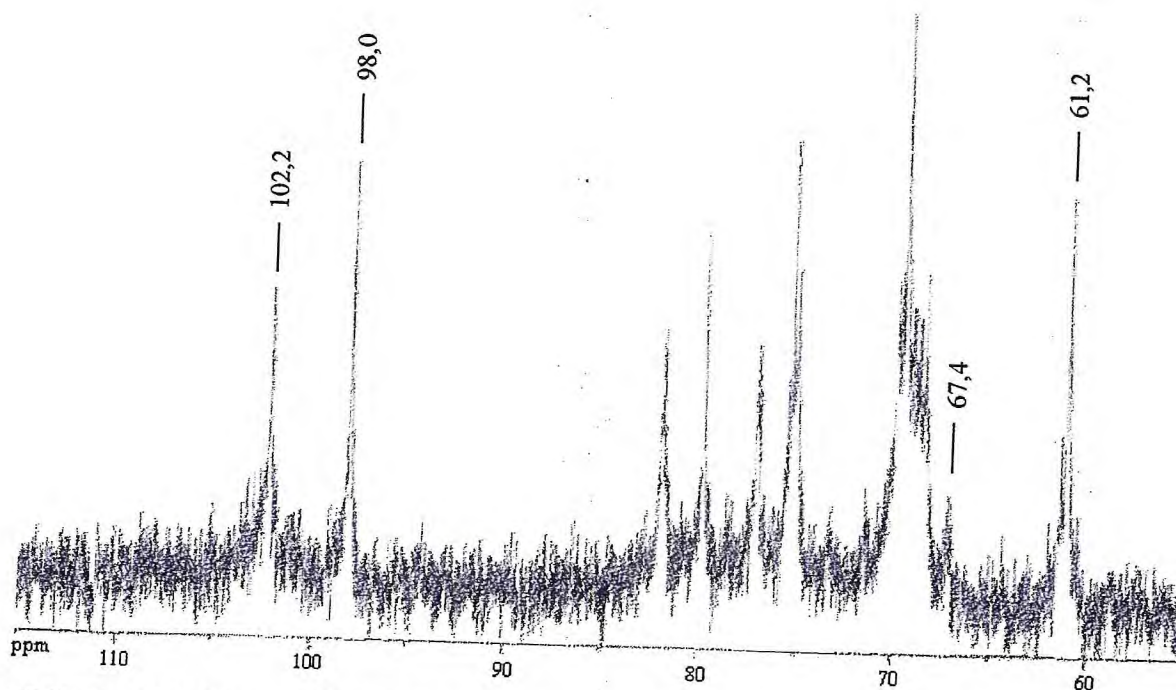


FIGURA 4.7. Espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc2.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc1 (FIGURA 4.6) apresenta sinais anoméricos, de baixa intensidade em 103,1 e 100,8 ppm referentes a unidades β -D-galactopiranoose, ligada a unidades de α -L-galactopiranoose-(6-sulfato).

Os espectros das frações extraídas a quente, Gc2 e Gc3 (FIGURAS 4.7 e 4.8, respectivamente), apresentam na região anomérica sinais em 102,0 e 98,0 ppm referentes a unidades de β -D-galactopiranoose (102,2 ppm) 6-O-metilada ou não, ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose (98,0 ppm).

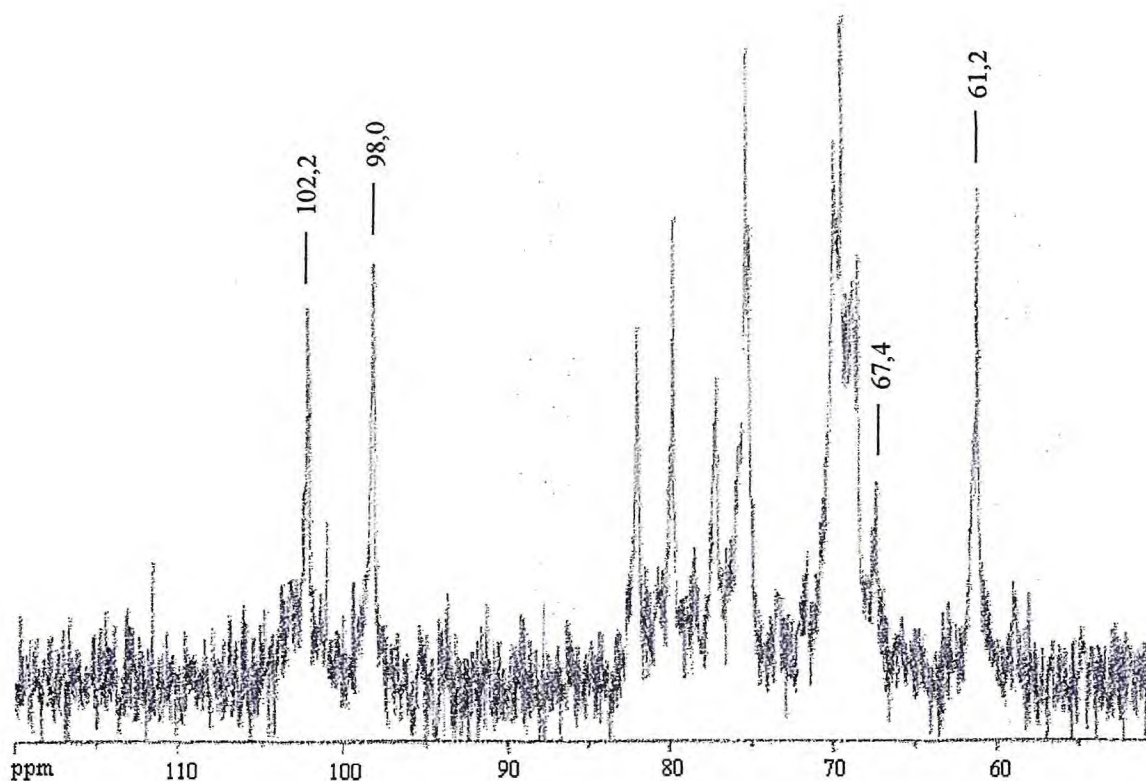


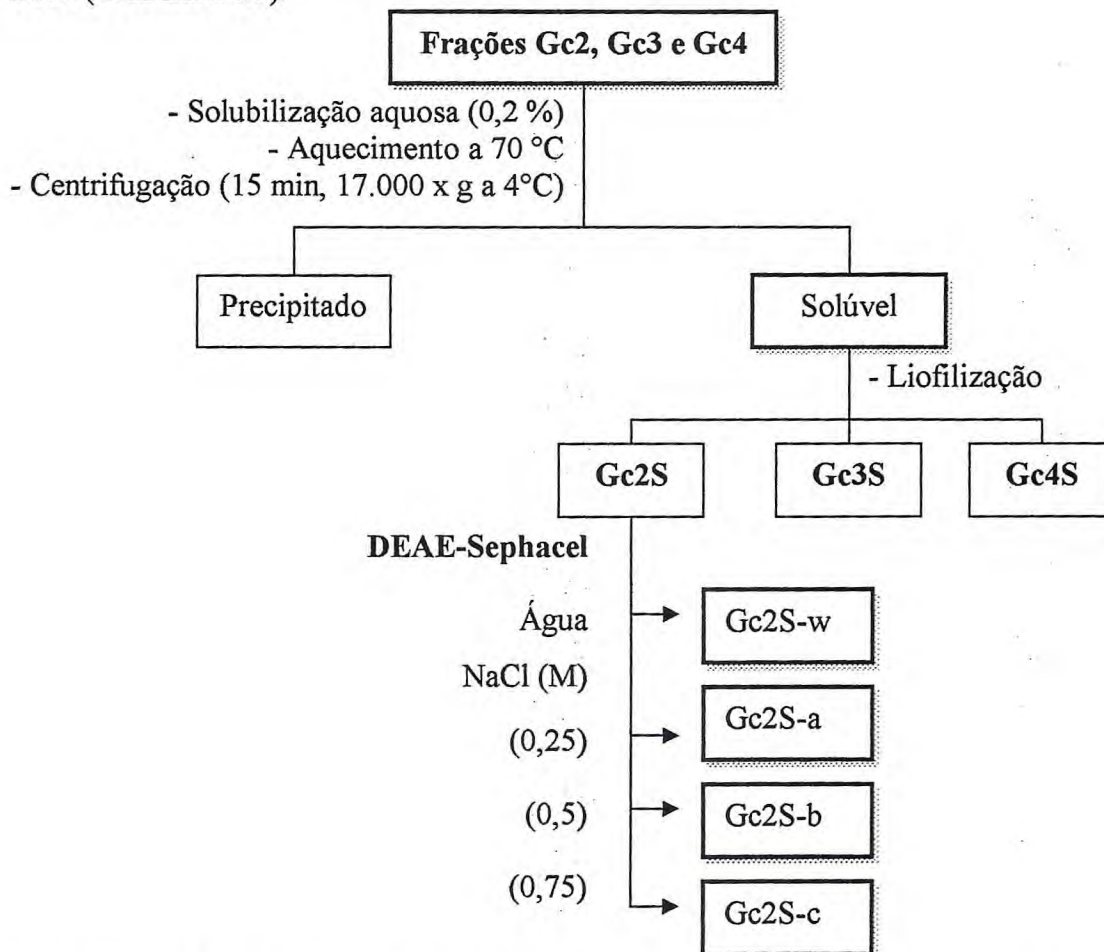
FIGURA 4.8. Espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc3.

Os espectros de RMN de ^{13}C destas frações apresentam uma relação sinal/ruído baixa, o que poderia estar dificultando a observação dos sinais correspondentes a unidades de β -D-galactopiranosose (103,1 ppm) ligadas a unidades de α -L-galactopiranosose-6-sulfato (100,8 ppm). Vale a pena ressaltar que a análise da composição monossacarídica (TABELA 4.3) indica a presença de unidades de α -L-galactopiranosose (C-6 sulfatada ou não), desde que a relação AnGal:Gal é menor que 1. Esta menor relação pode ser alternativamente, decorrente do processo de hidrólise reductiva, a qual não ocasionou a recuperação total das unidades anidroglicosídicas.

4.2. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Gracilaria cornea* POR SOLUBILIZAÇÃO AQUOSA

4.2.1. Obtenção e análise química

As frações brutas de maiores rendimentos da alga *G. cornea* foram submetidas ao fracionamento por solubilização aquosa, com a finalidade de separar diferentes componentes. Portanto, as frações Gc2, Gc3 e Gc4 foram ressolubilizadas em água (0,2 %) e mantidas sob aquecimento (70 °C) até completa solubilização (ESQUEMA 4.1). Essas frações foram deixadas para esfriar até atingirem temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), depois centrifugadas, liofilizadas, originando as frações solúveis Gc2S, Gc3S e Gc4S (TABELA 4.5).



ESQUEMA 4.1. Purificação dos polissacarídeos obtidos da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*.

Os rendimentos em relação às quantidades iniciais de polissacarídeos brutos, utilizados para o fracionamento por solubilização aquosa, foram muito semelhantes para todas as frações, com valores decrescentes de 44,4; 39,4 e 30,7 % para Gc2S, Gc4S e Gc3S, respectivamente (TABELA 4.5).

TABELA 4.5. Rendimento e análise química das frações de *Gracilaria cornea*, obtidas após fracionamento e solubilização aquosa.

Fração ^a	Rendimento ^b (%)	Carboidrato (%)	Sulfato NaSO ₃ (%)	Proteína (%)	[α] _D (°)
Gc2S	44,4	80,1	13,5	6,6	- 21,0
Gc3S	30,7	79,9	10,8	3,0	- 36,5
Gc4S	39,4	88,4	10,7	2,2	- 25,5

a = Gc2S, Gc3S e Gc4S são as frações solúveis em meio aquoso de Gc2, Gc3 e Gc4, respectivamente, a 0,2 %.

b = rendimento expresso em termos do material recuperado após fracionamento.

De acordo com a TABELA 4.5, o fracionamento dos polissacarídeos por tratamento aquoso, seguido de centrifugação, possibilitou a obtenção de frações solúveis com teores mais elevados de proteína, variando de 2,2 a 6,6 %, sugerindo na fração solúvel, a formação de algum agregado ou complexo proteína-carboidrato, ou até mesmo de um polímero híbrido, com uma pequena porção protéica em sua cadeia polissacarídica. A rotação óptica específica das frações Gc2S (- 21,0°), Gc3S (- 36,5°) e Gc4S (- 25,5°) foram negativas, o que sugere classificação de agaranas para essas galactanas. Devido à purificação, as frações solúveis ainda apresentaram teores de sulfato um pouco mais elevados que os teores encontrados para suas respectivas frações brutas.

4.2.2. Composição monossacarídica

Os constituintes monossacarídicos da fração solúvel Gc2S foram similares aos encontrados para a fração bruta Gc2, com pequenas diferenças nas porcentagens (TABELA 4.6). Como pode ser observado, houve uma perda maior das unidades anidrogalactosídicas, com uma relação AnGal:Gal de 0,53, menor do que a relação encontrada para a fração Gc2 (0,75). Ainda em relação à fração Gc2, houve um pequeno aumento nas porcentagens de xilose e decréscimo nas unidades de 6-*O*-metilgalactose na fração Gc2S.

TABELA 4.6. Comparação entre a composição monossacarídica das frações Gc2 e Gc2S de *Gracilaria cornea*.

Fração	Monossacarídeos (mol %) ^a					
	3,6 AnGal ¹	Xil ²	6MeGal ³	3 e 4MeGal ⁴	Gal ⁵	Glc ⁶
Gc2	37,8	2,0	9,9	tr.	50,3	tr.
Gc2S	30,5	3,3	7,0	1,0	57,2	1,0

a = na forma de acetato de alditóis, por CLG (STEVENSON; FURNEAUX, 1991).

1, 2, 3, 4, 5 e 6 = abreviatura dos monossacarídeos (3,6AnGal = 3,6-anidrogalactose; Xil = xilose; 6MeGal = 6-*O*-metilgalactose; 3 e 4MeGal = 3-*O*-metilgalactose e 4-*O*-metilgalactose; Gal = galactose e Glc = glucose).

tr. = traços (< 1 mol %).

4.2.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho das frações solúveis Gc2S, Gc3S e Gc4S (FIGURAS 4.9, 4.10 e 4.11) apresentaram absorbâncias em 1250 cm^{-1} , referentes ao éster sulfato, mais elevadas que as absorbâncias observadas para as frações brutas que lhes deram origem (Gc2, Gc3 e Gc4, respectivamente). Esses dados podem ser confirmados pelos teores de sulfato também mais elevados nas frações solúveis, variando de 10,7 a 13,5 % (TABELA 4.5), enquanto que para as frações brutas os valores variaram de 7,8 a 8,6 % de sulfato (TABELA 4.1, pág 74).

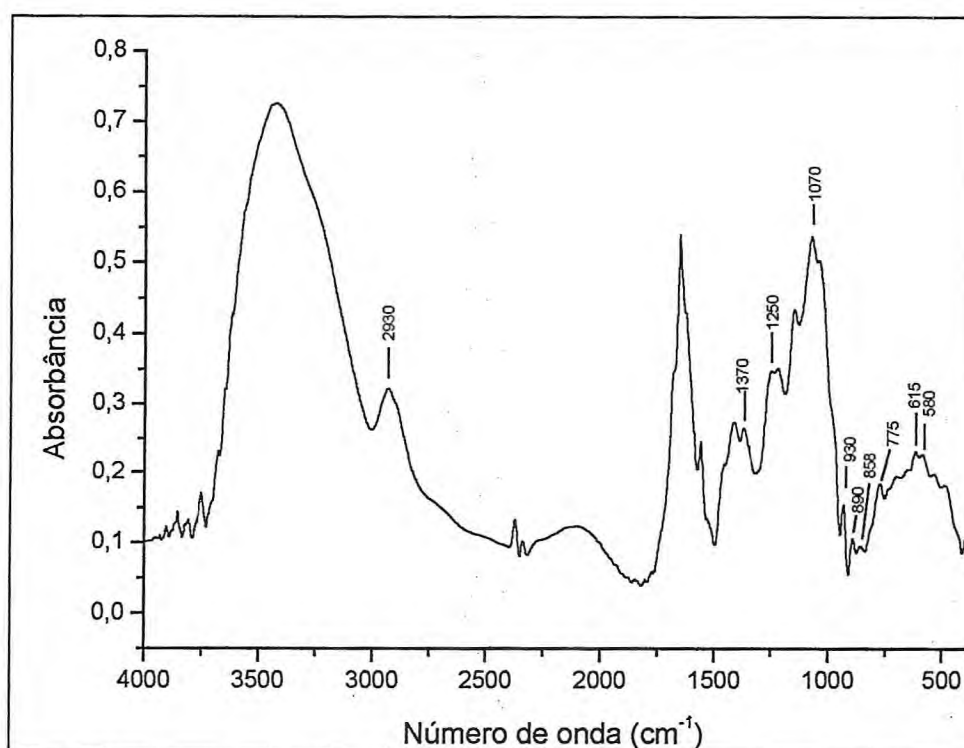


FIGURA 4.9. Espectro na região de infravermelho da fração Gc2S em pastilha de KBr.

As frações solúveis extraídas à quente apresentaram também absorbância referente ao esqueleto das galactanas (1070 cm^{-1}). Seus perfis foram muito semelhantes principalmente nas regiões de 930 e 890 cm^{-1} (3,6-anidrogactose e C-6 da β -D-galactose, respectivamente). Ainda pode ser observado um discreto pico em torno de 850 cm^{-1} , indicando a presença, mesmo que em pequena quantidade, da unidade A sulfatada em C-4 (β -D-galactose-4-sulfato – ver TABELA 4.4, pág 80).

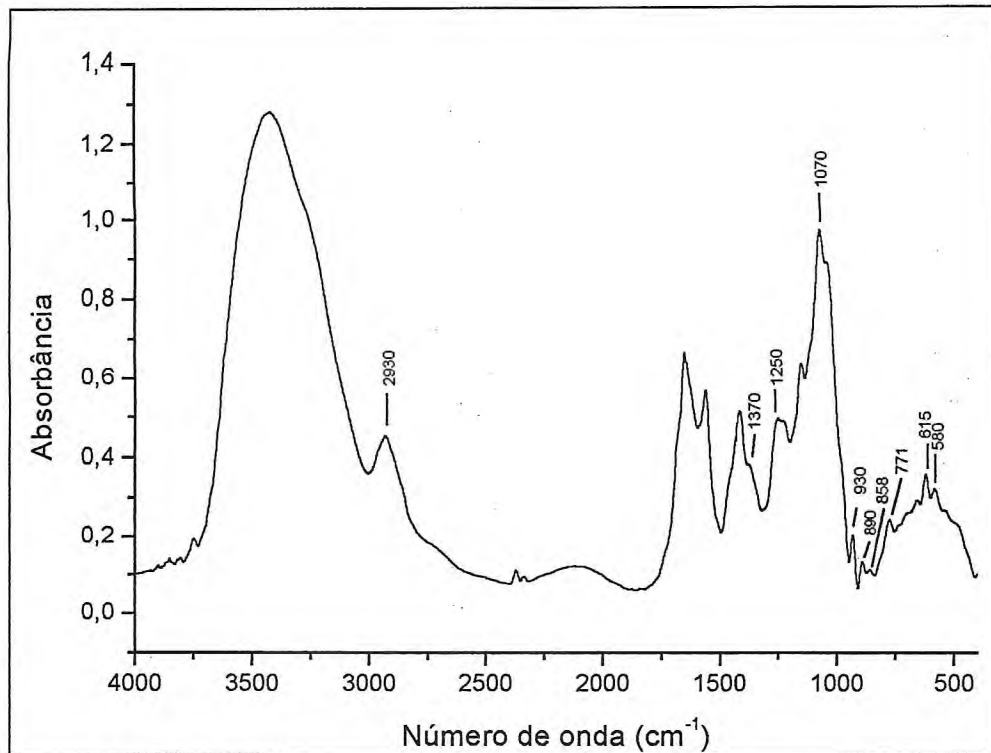


FIGURA 4.10. Espectro na região de infravermelho da fração Gc3S em pastilha de KBr.

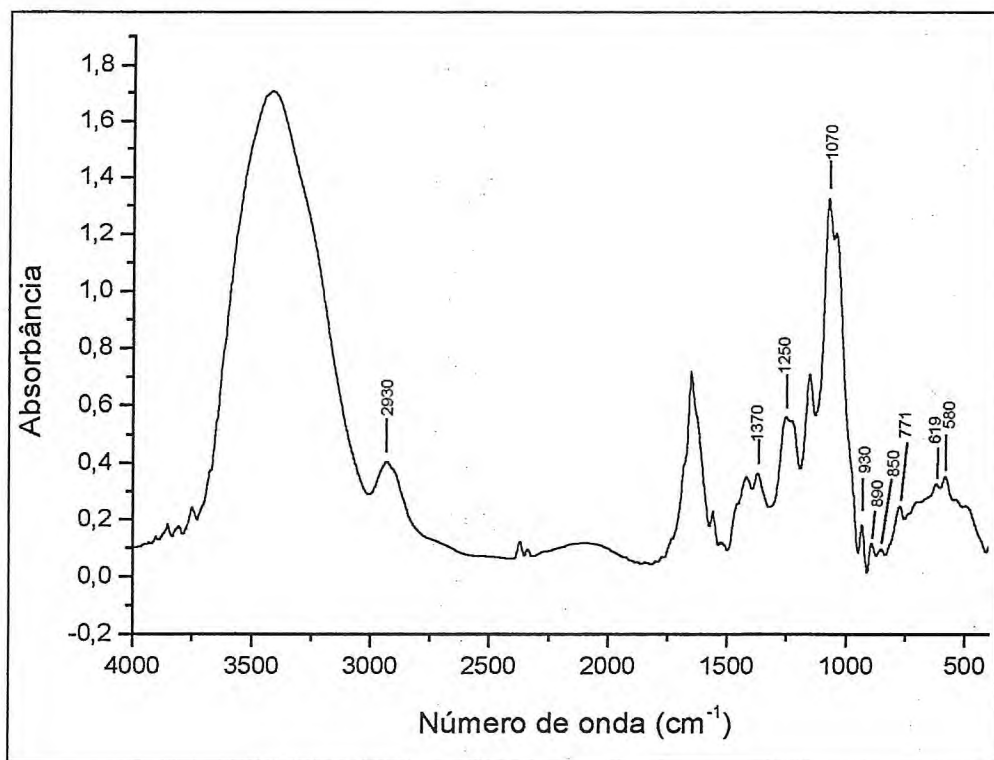


FIGURA 4.11. Espectro na região de infravermelho da fração Gc4S em pastilha de KBr.

4.2.4. Determinação da massa molar

Tanto polímeros sintéticos quanto naturais são polidispersos. Isso significa que, em geral, eles não têm uma massa molar nitidamente definida, mas sim, uma média de massa molar representando uma distribuição de espécies moleculares que podem ser quase idênticas na estrutura, mas com tamanho da cadeia diferente (STANLEY, 1995).

A distribuição das massas molares das frações solúveis de *G. cornea* foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC), com o emprego de pululanas como padrão de calibração das cromatografias. As FIGURAS de 4.12 a 4.16, trazem os perfis cromatográficos das frações Gc1, Gc1rep, Gc2S, Gc3S e Gc4S, respectivamente.

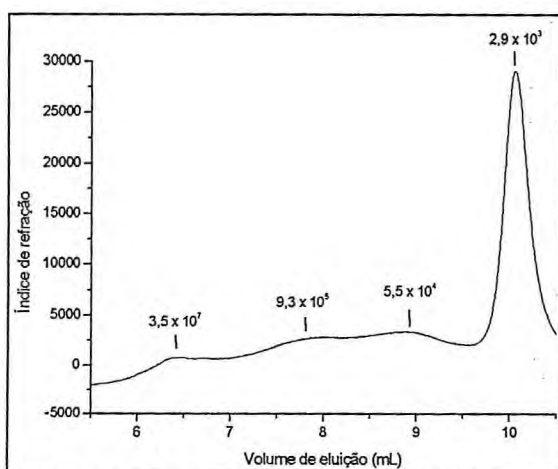


FIGURA 4.12. Cromatograma de GPC da fração Gc1.

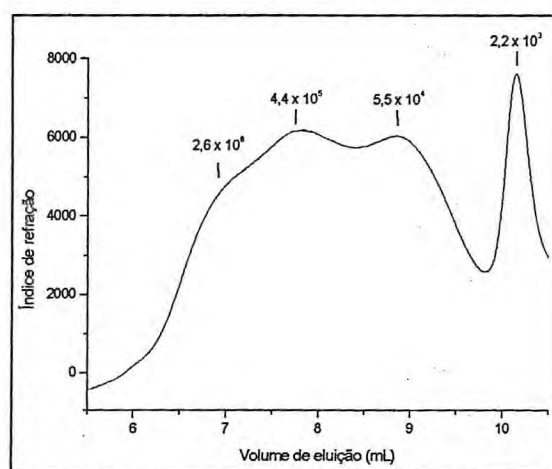


FIGURA 4.13. Cromatograma de GPC da fração Gc1rep.

A comparação dos perfis cromatográficos das FIGURAS 4.12 e 4.13, referentes às frações Gc1 e Gc1rep, respectivamente, permite perceber uma distribuição de massa semelhante entre as duas frações, com uma nítida acentuação dessa distribuição após reprecipitação com etanol da fração Gc1. Essa segunda precipitação etanólica pode ter promovido a remoção do excesso de sais oriundos da primeira extração à quente, permitindo uma visualização melhor da distribuição de massas da fração polissacarídica.

Segundo as análises de GPC das frações solúveis Gc2S, Gc3S e Gc4S (FIGURAS 4.14, 4.15 e 4.16, respectivamente), é possível observar que todas possuem um caráter heterogêneo, e apresentam contaminações de baixa massa molar, com volumes de eluição em torno de 10 mL.

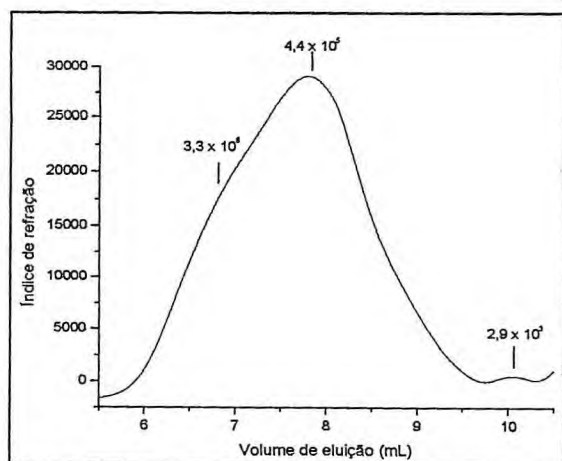


FIGURA 4.14. Cromatograma de GPC da fração Gc2S

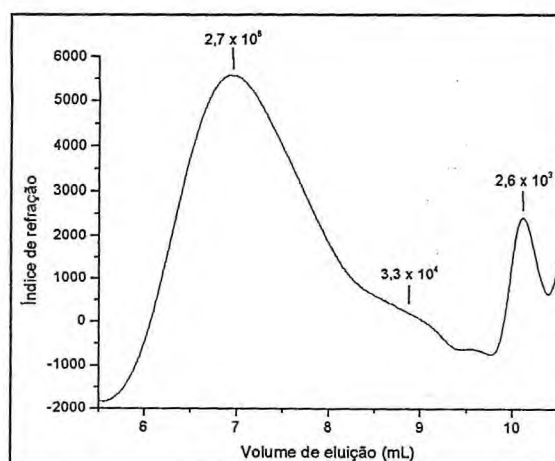


FIGURA 4.15. Cromatograma de GPC da fração Gc3S.

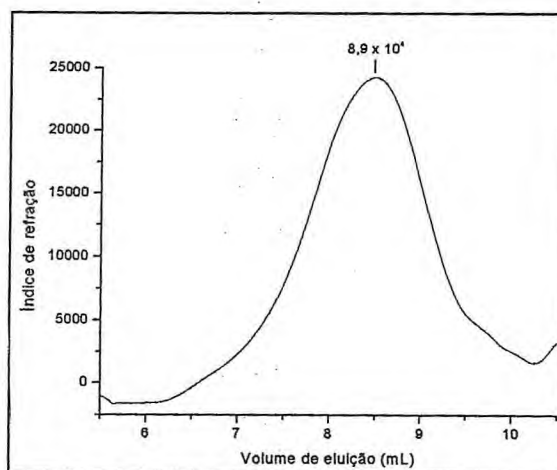


FIGURA 4.16. Cromatograma de GPC da fração Gc4S.

O principal pico da fração Gc3S (FIGURA 4.15), com volume de eluição de 6,95 mL (Pico 1), indicou uma massa molar de $2,7 \times 10^6$ g/mol. Essa elevada massa molar pode ser justificada por agregações entre as cadeias polissacarídicas, o que também pode ser observado pelo perfil altamente heterogêneo, e ombro com volume de eluição de 8,95 mL.

Agregações também foram observadas no GPC da fração Gc2S (FIGURA 4.14), com um alargamento no volume de eluição de 6,87 mL. O principal pico com volume de eluição de 7,80 mL (Pico 2) indicou uma massa molar de $4,4 \times 10^5$ g/mol.

A fração Gc4S (FIGURA 4.16) apresentou uma massa molar mais baixa ($8,9 \times 10^4$ g/mol – Pico 1) e um perfil menos heterogêneo que as outras duas frações anteriormente mencionadas. A TABELA 4.7 ilustra a distribuição das massas molares das frações Gc1, Gc1rep, Gc2S, Gc3S e Gc4S.

TABELA 4.7. Massas molares para cada pico das frações solúveis de polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria cornea*.

Frações	Picos	Volume de Eluição (mL)	Massa Molar (g/mol)
Gc1	1	6,35	$3,5 \times 10^7$
	2	7,75	$9,3 \times 10^5$
	3	8,85	$5,5 \times 10^4$
	4	10,05	$2,9 \times 10^3$
Gc1rep	1	7,0	$2,6 \times 10^6$
	2	7,80	$4,4 \times 10^5$
	3	8,85	$5,5 \times 10^4$
	4	10,15	$2,2 \times 10^3$
Gc2S	1	6,87	$3,3 \times 10^6$
	2	7,80	$4,4 \times 10^5$
	3	10,05	$2,9 \times 10^3$
Gc3S	1	6,95	$2,7 \times 10^6$
	2	8,95	$3,3 \times 10^4$
	3	10,10	$2,6 \times 10^3$
Gc4S	1	8,50	$8,9 \times 10^4$

O pico 1 da fração Gc1 está fora do limite de exclusão da coluna, pois está acima de 10^6 , correspondente ao limite superior de massa para os padrões de pululanases. Os valores em negrito correspondem ao(s) principal(is) pico(s) obtido(s).

4.2.5. Dessulfatação solvolítica (solvólise) das frações Gc2 e Gc2S

A análise estrutural de galactanas usualmente requer a determinação da posição do sulfato na cadeia polissacarídica. Ela pode ser deduzida pela comparação da análise de metilação entre o polissacarídeo nativo e o dessulfatado. Assim, uma elucidação estrutural acurada implica na aplicação de métodos de dessulfatação que conduzem à remoção do sulfato sem modificação do polissacarídeo (KOLENDER; MATULEWICZ, 2004).

A galactana Gc2 foi submetida à dessulfatação solvolítica, na forma de sal de piridônio, com tratamento com uma mistura reativa (DMSO:metanol:piridina), aquecimento a 100 °C, por 4 horas, como descrito no item 3.9, pág. 67.

A fração submetida à dessulfatação (Gc2-D) não apresentou redução no teor de sulfato, mantendo seu conteúdo em 8,7 %, semelhante à fração nativa Gc2 com 8,6 % de sulfato. Diante disso, a fração Gc2 foi empregada para elaboração de uma curva de hidrólise, nos tempos de 4, 6, 8 e 10 horas de solvólise (TABELA 4.8).

TABELA 4.8. Curva de dessulfatação solvolítica da fração Gc2

Tempo de Reação (horas)	Sulfato ^a NaSO ₃ (%)
4	8,9
6	8,6
8	7,8
10	8,6

a = DODGSON, 1961.

Como pode ser observado na TABELA 4.8, não houve diferenças significativas, nem redução do teor de sulfato, para o polissacarídeo submetido à curva hidrolítica, mesmo com o tempo de 10 horas de hidrólise.

Em virtude disso, a dessulfatação solvolítica foi realizada novamente, mas desta vez, pelo emprego da fração Gc2S, com 13,5 % de NaSO₃. A fração solúvel submetida à dessulfatação (Gc2S-D), apresentou 6,4 % de sulfato, representando uma redução de 52,6 % no teor de sulfato, muito inferior à redução encontrada para uma agarana com algumas unidades A sulfatadas em C-4, e unidades B sulfatadas em C-3 e C-2,3, obtida da

alga *Osmundaria obtusiloba*, com aproximadamente 70,0 % de dessulfatação (CASSOLATO, 2004).

De acordo com Forrester et al. (1976 apud MILLER; BLUNT, 1998), durante a hidrólise ácida, o éster de sulfato adjacente ao carbono anomérico é mais susceptível à hidrólise. Quando Miller e Blunt (1998) examinaram a dessulfatação de algumas galactanas, observaram que na dessulfatação de uma lambda-carragenana, ambos ésteres de sulfato nos carbonos 2 foram removidos, mas em C-6 não houve uma remoção completa. Dessa forma, pode-se deduzir que quanto mais distante do carbono anomérico estiver o sulfato, menos susceptível à dessulfatação ele será, sendo por conseguinte, mais estável o posicionamento do grupo sulfato em C-6 do que em outras posições.

Sendo assim, de acordo com esses resultados, pode-se inferir que a completa solubilização da fração bruta Gc2 foi fator limitante para que a reação hidrolítica não ocorresse a contento. Porém, uma vez o material bem solubilizado, o posicionamento do grupo sulfato, deixa-o mais ou menos acessível à hidrólise. De acordo com o espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc2S-D (FIGURA 4.17), apesar de bastante ruído devido a pequena quantidade de amostra para a realização do experimento (~20 mg), pode-se ainda observar o sinal em 67,4 ppm, correspondente ao resíduo de α -L-galactose-6-sulfato, indicando a permanência de éster sulfato em C-6, carbono mais distante do carbono anomérico, menos acessível e portanto menos susceptível à solvólise.

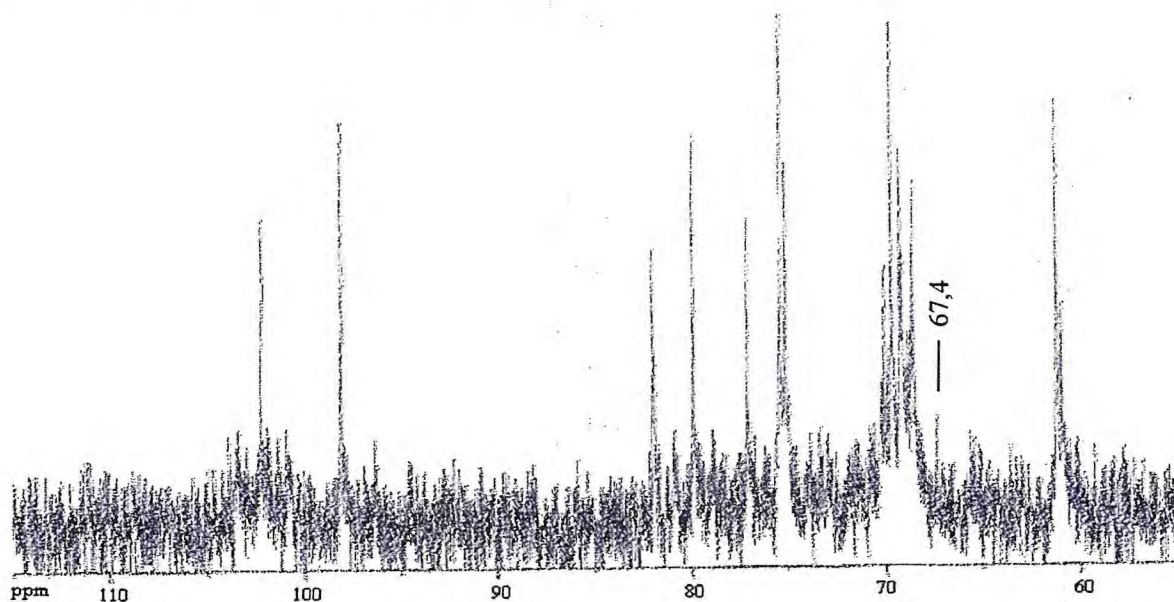


FIGURA 4.17. Espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc2S-D.

4.2.6. Tratamento alcalino da fração Gc2S

Segundo Armisen (1995) altas quantidades de 3,6-anidrogactose são usualmente associadas com géis fortes, enquanto que um alto conteúdo de sulfato é associado a géis mais fracos. Geralmente, espécies de *Gracilaria* produzem ágar com baixa qualidade devido ao seu relativamente alto conteúdo de sulfato (MARINHO-SORIANO, 2001). No entanto, a qualidade do ágar pode ser melhorada pelo tratamento alcalino, o qual converte L-gactose-6-sulfato em 3,6-anidro-L-gactose, em meio contendo hidróxido de sódio (ARMISEN, 1995).

4.2.6.1. Estudo cinético da reação de ciclização

O estudo cinético da reação de ciclização foi realizado com a fração Gc2S. O acompanhamento da reação de ciclização foi feito pelo aumento no teor de 3,6-anidrogactose usando o método de Resorcinol (YAPHE, 1960). Com esses resultados foram calculados a constante de velocidade da reação (k) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as temperaturas de 60, 70 e 80 °C (TABELA 4.9). A fórmula para obtenção de $t_{1/2}$ é:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

TABELA 4.9. Reação de ciclização da fração Gc2S em NaOH, a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Const. de velocidade, k (10^4 s^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
60	1,8	104,5
70	2,7	43,1
80	5,8	19,7

As constantes da reação de ciclização nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C mostradas na TABELA 4.9 para a fração Gc2S, uma agarana com sulfatação em C-6 da unidade β -D-gactose (ver espectro de RMN de ^{13}C para Gc2S-TA – FIGURA 4.21),

foram muito similares às constantes de velocidade nas mesmas temperaturas encontradas para a porfirana PC75, uma agarana sem sulfatação na unidade de β -D-galactose ($1,0, 1,5$ e $4,9 \times 10^4 \text{s}^{-1}$, respectivamente - NOSEDA et al., 2000).

A posição do grupamento sulfato na unidade de β -D-galactose pode acelerar ou retardar a velocidade da reação de ciclização. Em lambda-carragenana, a presença de sulfato em C-2 da unidade β -D-galactose faz com que a reação ocorra mais lentamente, enquanto que sulfato em C-4 como nas carragenanas da família kappa, acelera a reação de ciclização (CIANCIA et al., 1993; NOSEDA; CERESO, 1995; VIANA et al., 2004). Logo, a presença de β -D-galactose-4-sulfato, em baixas percentagens, detectada por análise de FT-IR, aliada a presença de sulfato em C-6 na mesma unidade, poderia justificar os discretos valores mais elevados na velocidade de ciclização para a fração Gc2S em comparação com a fração PC75, e os consequentes tempos de meia-vida mais elevados para PC75 em todas as temperaturas (139, 77 e 23 minutos nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C, respectivamente).

A reação de ciclização para a fração Gc2S seguiu, como previsto por Ciancia et al. (1993), uma cinética de pseudo primeira ordem determinada pela linearidade da curva de $\ln(A_0 - A_\infty/A_t - A_\infty)$ em função do tempo, onde A é a absorbância determinada por resorcinol (FIGURA 4.18).

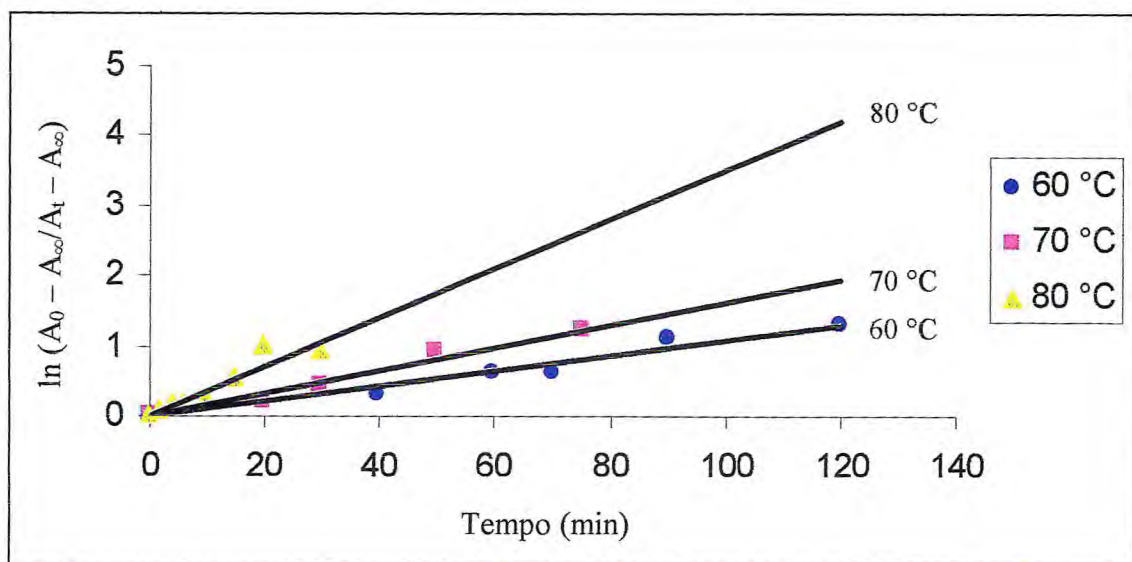


FIGURA 4.18. Curvas utilizadas para determinar a constante de velocidade (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C.

4.2.6.2. Tratamento alcalino preparativo

O tratamento alcalino é muito usado industrialmente para melhorar a qualidade do gel. Em laboratório, é utilizado para determinação quantitativa dos resíduos de α -L-galactose-6-sulfato, considerados unidades precursoras de 3,6-anidro-L-galactose (CIANCIA et al., 1993).

Com a finalidade de se determinar o conteúdo de unidades precursoras, a fração Gc2S foi submetida ao tratamento alcalino preparativo (NOSEDA; CERESO, 1995), originando a fração Gc2S-TA com 54,5 % de rendimento e 7,5 % de sulfato (TABELA 4.10).

TABELA 4.10. Rendimento e análise química das frações Gc2S e Gc2S-TA.

Amostras	Rendimento ^a (%)	$[\alpha]_D$ ^b (°)	Sulfato ^c NaSO ₃ (%)
Gc2S	11,6	- 21,0	13,5
Gc2S-TA	54,5	- 42,0	7,5

a = Gc2S, relativo ao peso seco da alga submetida à extração; Gc2S-TA, relativo a massa inicial do polissacarídeos submetido ao tratamento alcalino preparativo.

b = rotação óptica específica, determinada em água na concentração de 0,2 % à temperatura de 20°C.

c = determinado pelo método de Dodgson, 1961.

O rendimento da fração Gc2S-TA de 54,5 % (TABELA 4.10), relativo à massa inicial do polissacarídeo submetido ao tratamento, foi inferior ao encontrado por Viana et al. (2004) para uma iota/nu-carragenana obtida de *Eucheuma denticulatum* (80 % de rendimento).

O valor da rotação óptica para Gc2S-TA (- 42,0 °) foi mais elevado que o determinado para Gc2S nativa (- 21,0 ° - TABELA 4.10). Valores mais elevados de rotação óptica podem ser justificados pelo aumento na regularidade da seqüência repetitiva da cadeia polissacarídica (NOSEDA et al., 2000). Essa regularidade da seqüência pode ser confirmada pela análise de composição monossacarídica das frações Gc2S e Gc2S-TA apresentada na TABELA 4.11.

TABELA 4.11. Composição monossacarídica das frações Gc2S e Gc2S-TA.

Frações	Monossacarídeos ^a (mol %)					
	3,6 AnGal ¹	Xil ²	6MeGal ³	3 e 4MeGal ⁴	Gal ⁵	Glc ⁶
Gc2S	30,5	3,3	7,0	1,0	57,2	1,0
Gc2S-TA	46,5	2,8	3,8	1,7	44,1	1,1

a = analisados na forma de acetato de alditóis, por CGL (STEVENSON; FURNEAUX, 1991);
 1, 2, 3, 4, 5 e 6 = abreviatura dos monossacarídeos (3,6AnGal = 3,6-anidrogalactose; Xil = xilose;
 6MeGal = 6-*O*-metilgalactose; 3 e 4MeGal = 3-*O*-metilgalactose e 4-*O*-metilgalactose; Gal =
 galactose e Glc = glucose.

O aumento do teor de 3,6-anidrogalactose (~16 %) com a concomitante diminuição (de ~ 13 %) no teor de galactose para as frações Gc2S e Gc2S-TA (TABELA 4.11) leva a concluir que Gc2S apresenta de 13 a 16 % de unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose (α -L-galactose-6-sulfato).

Pela comparação dos espectros de infravermelho das frações Gc2S e Gc2S-TA na região de 1400 a 600 cm^{-1} (FIGURA 4.19) pode ser observado o decréscimo na absorvância em 1250 cm^{-1} relativo a perda de sulfato através do tratamento alcalino para a fração Gc2S-TA, todavia não foi possível uma diferenciação mais definida na absorvância em 930 cm^{-1} , correspondente ao resíduo de 3,6-anidrogalactose entre as duas frações, provavelmente devido a pouca sensibilidade do método.

O espectro de RMN de ^{13}C para Gc2S permitiu uma melhor definição da região anomérica, apresentando sinais em 102,2 e 98,0 ppm, relativos a unidades de β -D-galactopiranosose 6-*O*-metiladas ou não, ligadas a unidades 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, e ainda sinais em 103,1 e 100,8 ppm correspondentes a β -D-galactopiranosose ligada a α -L-galactopiranosose-6-sulfato (FIGURA 4.20).

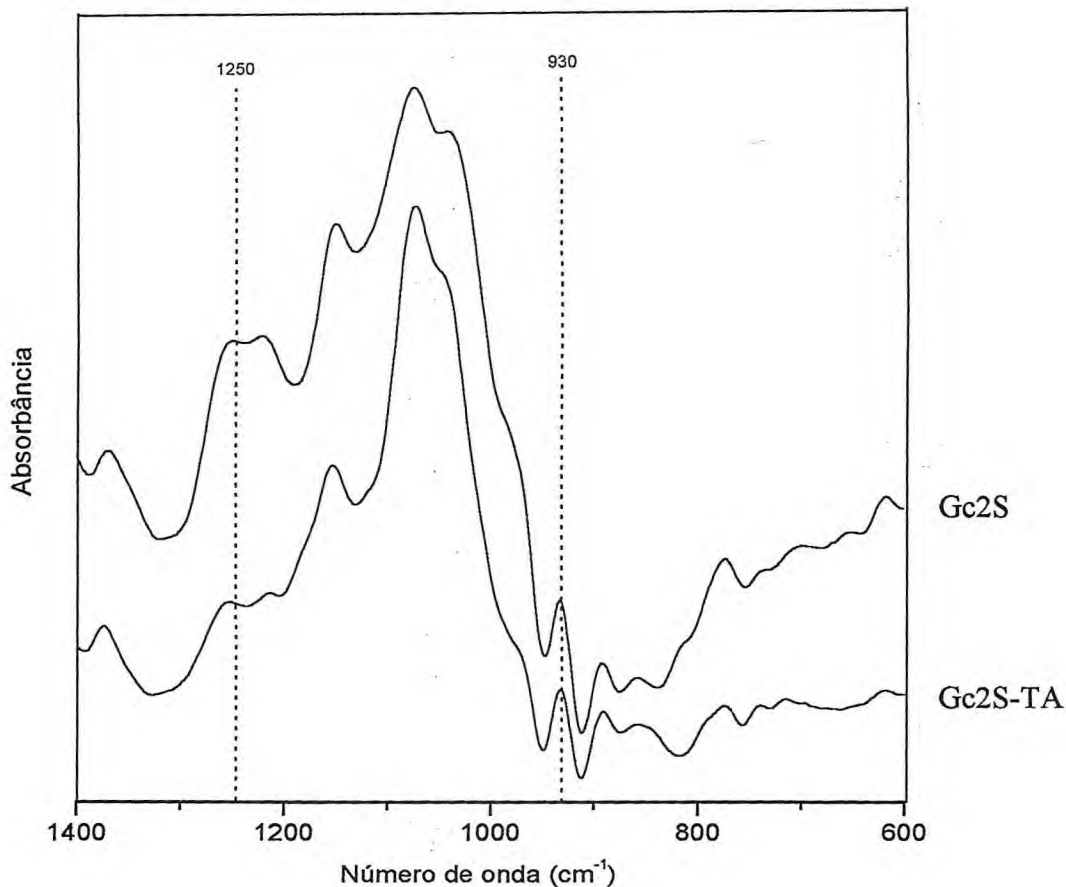


FIGURA 4.19. Comparação dos espectros na região de infravermelho das frações Gc2S e Gc2S-TA em pastilha de KBr.

No espectro de RMN de ^{13}C da fração submetida ao tratamento alcalino (FIGURA 4.21) há o desaparecimento dos sinais em 103,1 e 100,8 ppm relativos aos C-1 das unidades de β -D-galactose ligadas a unidades de α -L-galactose-6-sulfato. Este espectro apresenta dois sinais proeminentes e bem definidos na região anomérica em 102,2 e 98 ppm correspondentes a unidades de β -D-galactose ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactose. Este resultado está de acordo com a análise de composição monossacarídica da fração Gc2S-TA (TABELA 4.11) onde a relação galactose:anidrogalactose é $\sim 1:1$. A presença do sinal em 58,8 ppm foi atribuído ao carbono metílico localizado em C-6 das unidades de β -D-galactose. Nos campos mais baixos, pode-se observar também a redução do sinal em 67,4 ppm relativo ao C-6 da unidade de α -L-galactose-6-sulfato, presente no espectro de Gc2S.

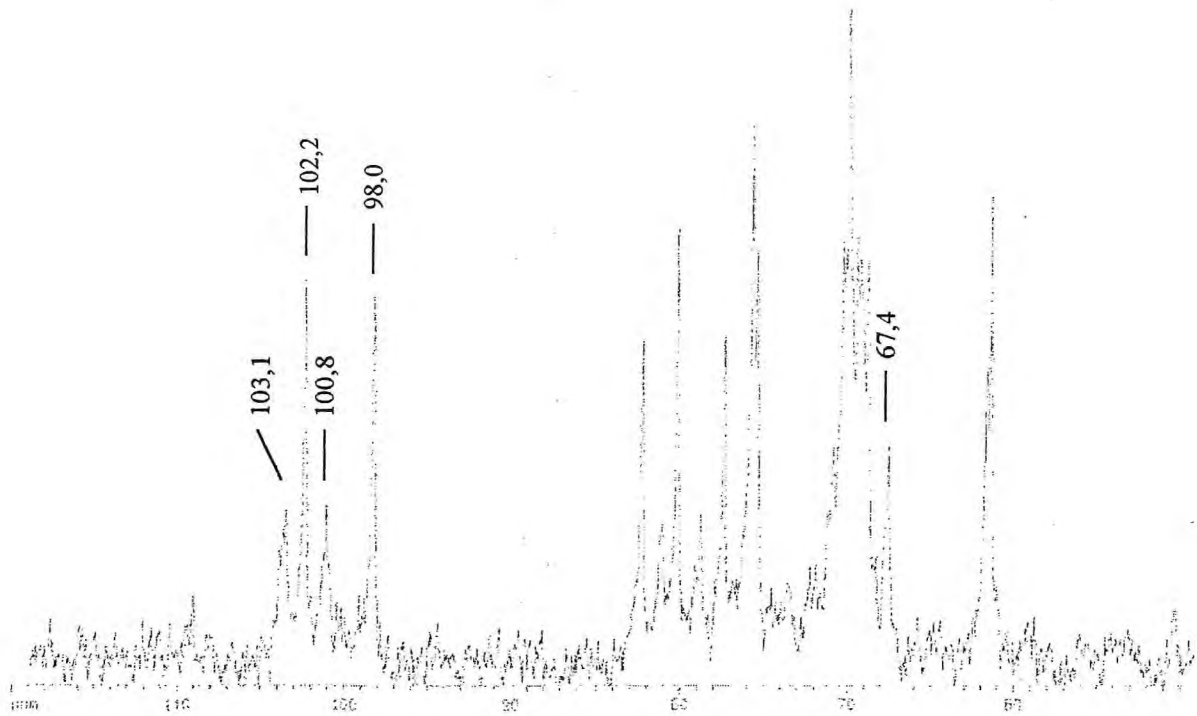


FIGURA 4.20. Espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc2S.

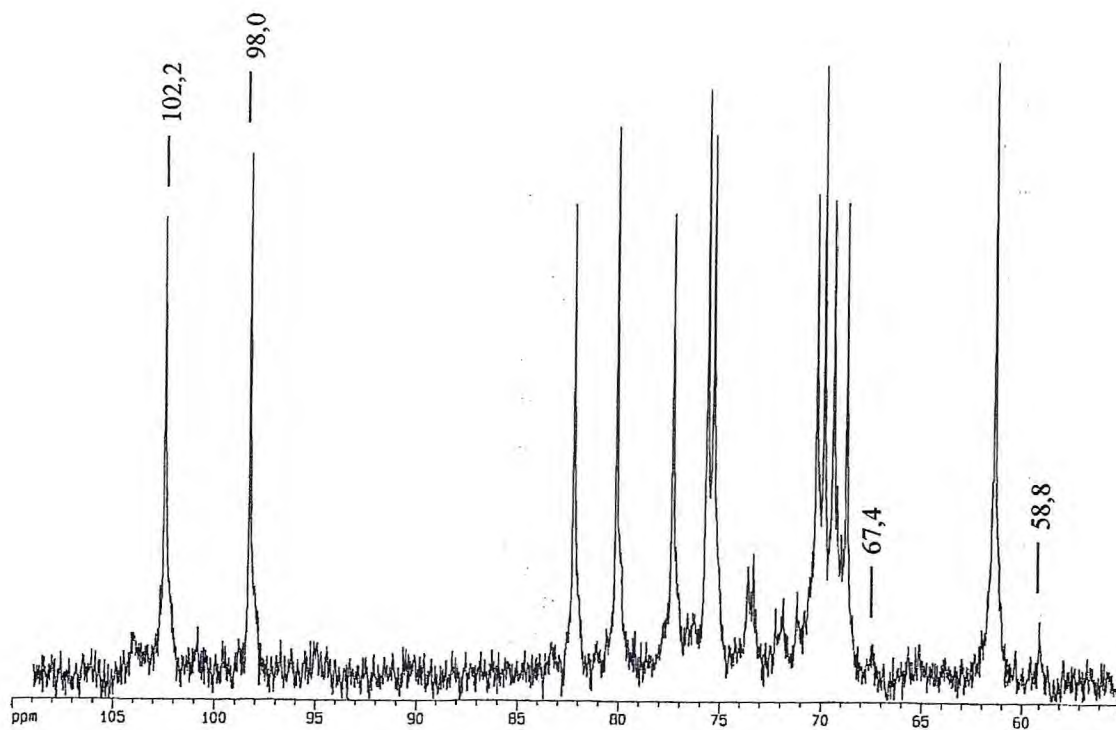


FIGURA 4.21. Espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc2S-TA.

Freile-Peigrín e Robledo (1997) estudaram o efeito do tratamento alcalino no rendimento, propriedades químicas e reológicas do ágar extraído da *Gracilaria cornea* coletada em Yucatan (México), a fim de avaliar seu potencial para uso industrial. Os testes foram realizados com NaOH, em diferentes concentrações, e com incubações a diferentes temperaturas. Eles observaram que não houve variação significativa no rendimento do ágar para todos os tratamentos com NaOH, e em todas as temperaturas. Contudo, concentrações mais elevadas de NaOH foram responsáveis por uma perda maior nos teores de sulfato, com concomitante aumento nos teores de 3,6-anidrogalactose, e conseqüente, aumento na força, ou seja, na qualidade do gel.

A forte relação inversa entre a força do gel e o conteúdo de sulfato, e a alta correlação entre a formação de 3,6-anidro-L-galactose com o aumento da concentração de NaOH, pode ser explicada pela eliminação do éster sulfato. A eliminação deste grupo ocorre através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), havendo a formação do anel 3,6-anidrogalactosídico, cujo mecanismo foi estabelecido por Percival (1949). Como resultado desta reação, as unidades de α-L-galactose passam de uma conformação ¹C₄ para ⁴C₁, fazendo com que a agarana possa adquirir uma conformação helicoidal, aumentando o poder de geleificação do polissacarídeo (MURANO, 1995).

4.2.7. Análises de metilação das frações Gc2S e Gc2S-TA

O processo de metilação é uma técnica muito antiga utilizada para a determinação da estrutura de polissacarídeos. O processo de metilação em polissacarídeos neutros utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, NaOH pulverizado e iodeto de metila foi realizado de acordo com Ciucanu e Kerek (1984). O uso de DMSO é apropriado, pois este é um solvente aprótico, que não apresenta hidrogênio ácido, e solubiliza tanto reativos orgânicos como inorgânicos.

No caso dos polissacarídeos sulfatados, os quais são altamente carregados, este método é pouco eficiente, devido a baixa solubilidade destes em DMSO, dificultando a interação dos reativos com o polissacarídeo. Para contornar o problema da baixa solubilidade das galactanas sulfatadas em DMSO, Stevenson e Furneaux (1991) desenvolveram uma forma para converter os polissacarídeos, que geralmente se encontram na forma de sal de sódio ou de potássio, em sal orgânico (trietilamônio). Eles propuseram diálise contra uma solução de trietilamina, que permite metilação direta devido a sua solubilidade em DMSO. Stortz e Cerezo (1993) obtiveram polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio utilizando resina catiônica (forma trietilamônio), sendo este método mais rápido e eficiente que o anterior, desde que o polissacarídeo não apresente alta viscosidade quando em solução.

As análises de metilação das frações Gc2S e Gc2S-TA foram conduzidas utilizando-se o método de Ciucanu e Kerek (1984), pelo tratamento prévio com trietilamina 5 % (item 3.11, pág. 69), com a finalidade de se obter os polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio, solúveis em DMSO. Após metilação, os polissacarídeos foram hidrolisados pelo método de hidrólise redutiva, descrito por Stevenson e Furneaux (1991). Os resultados das análises de metilação estão apresentados na TABELA 4.12. A metilação do polissacarídeo solúvel demonstrou que as unidades A desta galactana estão representadas majoritariamente por β -D-galactopiranosose (35 mol %), além desta unidade naturalmente metilada em C-6 (6-O-metil β -D-galactopiranosose, ~7 mol %). Baixa porcentagem de 2,4-Gal (1,7 mol %) também foi observada, correspondente a unidades de β -D-galactopiranosose 6-O-substituída (por unidades simples de xilopiranosose e/ou grupos O-sulfato).

TABELA 4.12. Análises de metilação das frações Gc2S e Gc2S-TA.

Derivado Metilado ^a	Gc2S (mol %) ^b	Gc2S-TA (mol %) ^b	Unidades Correspondentes
<u>Unidade A</u>			
2,4,6-MeGal	42,0	42,0	β Gal + β Gal6Me
2,4-MeGal	1,7	2,4	β Gal6S + β Gal6Xil
<u>Unidade B</u>			
2,3,6-MeGal	6,7	5,0	α -L-Gal
2-MeAG	32,7	39,0	α -L-3,6AnGal
2,3-MeGal	3,2	0	α -L-Gal6S
<u>Unidades A e/ou B ou indefinidas</u>			
2,6-MeGal	3,2	2,7	β Gal4? + α -L-Gal3?
3/4-MeGal	2,2	1,7	β Gal2,6? + α -L-Gal2,6?
Gal	1,5	3,7	β Gal + α -L-Gal
<u>Unidades Terminais</u>			
2,3,4-MeXil	3,8	3,5	Xil

a = acetato de alditois parcialmente metilados obtidos a partir de metilação segundo Ciucanu e Kerek, 1984.

b = quantificação na forma de acetato de alditois parcialmente metilados (STEVENSON; FURNEAUX, 1991).

Na galactana nativa unidades de 3,6-anidrogalactopiranosose constituem aproximadamente 77 % das unidades B. A presença do derivado 2,3-Gal indica unidades precursoras de α -L-galactopiranosose 6-sulfato. Ressalta-se que pelos resultados de análise de composição monossacarídica (TABELA 4.11) do polissacarídeo solúvel após tratamento alcalino houve um aumento de 16 % no teor de 3,6-anidrogalactose. Deste modo a porcentagem de unidades precursoras (8,4 mol %) obtida pela análise de metilação é a metade da esperada pelos resultados comparativos da composição monossacarídica. Resultado semelhante foi obtido na análise de metilação de alguns polissacarídeos como em *Chondria macrocarpa* (FURNEAUX; STEVENSON, 1990) e *Acanthophora spicifera*

(DUARTE et al., 2004) onde, o teor de 2,3-Gal, determinado por hidrólise reductiva foi menor do que o esperado, não se conhecendo uma explicação para tal fato.

A galactana de *Gracilaria cornea* apresenta ainda parte das unidades B (6,7 mol %) não substituída (α -L-galactopiranoose). A presença de 2,3,4-Xil (3,8 mol %) confirma que estas unidades são substituintes simples na cadeia principal da galactana. O posicionamento desta unidade não pode ser definitivamente determinado devido ao aparecimento do derivado 2,6-Gal. Este pode ser correspondente a unidades de β -D-galactopiranoose e α -L-galactopiranoose substituídas por unidades simples de xilose (ou grupos *O*-sulfato) em C-4 e C-3, respectivamente. Assim nesta galactana a xiloglicosilação poderia estar ocorrendo em C-6 e/ou C-4 das unidades de β -D-galactopiranoose e/ou em C-3 das unidades de α -L-galactopiranoose.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração Gc2S apresenta sinais anoméricos, de baixa intensidade em 103,7 ppm e em 101,0 ppm. O primeiro sinal pode corresponder a unidades de xilose glicosilando o C-6 de unidades de β -D-galactopiranoose (USOV; BILAN; SHASHKOV, 1997), enquanto o segundo pode ser atribuído ao C-1 de unidades de xilose em C-3 das unidades de α -L-galactopiranoose (USOV; ELASHVILI, 1991). Os resultados de metilação (TABELA 4.12) estão de acordo com estas duas possibilidades uma vez que entre os produtos de metilação estão presentes os derivados 2,4MeGal e 2,6MeGal.

A análise de metilação da fração submetida ao tratamento alcalino (Gc2S-TA) é semelhante ao do polissacarídeo nativo, com exceção do desaparecimento dos derivados metilados correspondentes às unidades precursoras. O aumento na porcentagem do derivado 2-*O*-metil 3,6-anidrogactose (32,7 \rightarrow 39,0) foi menor do que o esperado (46,5 % - TABELA 4.12). Tal fato pode ser decorrente da degradação das unidades anidrogactosídicas durante o processo de metilação.

Em resumo, estes resultados demonstram que Gc2S é uma galactana do tipo agarana, constituída principalmente por unidades de β -D-galactopiranoose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose onde as unidades precursoras são totalmente ciclizadas após tratamento alcalino. Adicionalmente esta agarana apresenta metoxilação e sulfatação em C-6 de parte das unidades A, o que tem sido reportado para outras espécies de *Gracilaria* tais como *G. cervicornis* (FREILE-PELEGRIN; MURANO, 2005; LAHAYE; YAPHE, 1989) e *G. multipartita* (MURANO, 1995).

Deste modo esta agarana, após tratamento alcalino, apresenta um estrutura repetitiva similar ao da agarose parcialmente metilada, sendo portanto um polissacarídeo com potencial interesse industrial.

4.3. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO Gc2S POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA

4.3.1. Obtenção e análise química

Devido ao maior rendimento e caráter heterogêneo observado pela análise de GPC, a fração Gc2S foi a escolhida para ser submetida à cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-Sephacel, utilizando como eluentes água e soluções de NaCl (0,25, 0,50 e 0,75 M). O rendimento e a composição química das subfrações obtidas estão apresentados na TABELA 4.13.

TABELA 4.13. Rendimento e análise química das subfrações obtidas após cromatografia de troca-iônica da fração Gc2S.

Subfração ^a	Eluente (NaCl)	Rendimento ^b (%)	Carboidrato (%)	Sulfato (%)	Proteína (%)	$[\alpha]_D$
Gc2S-w	-	14,2	n.d.	0,5	n.d.	n.d.
Gc2S-a	0,25 M	11,9	64,9	10,6	3,3	- 40,2
Gc2S-b	0,5 M	18,2	63,5	12,9	1,8	- 42,7
Gc2S-c	0,75 M	21,3	50,2	14,8	2,7	- 31,2

a = subfrações obtidas após cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel), eluídas com NaCl: GC2S-w (água), Gc2S-a (0,25 M), Gc2S-b (0,5 M) e Gc2S-c (0,75 M).

b = rendimento calculado em relação à quantidade de Gc2S recuperada após o fracionamento em DEAE-Sephacel.

n.d. = não determinado.

O baixo rendimento total obtido para o fracionamento de Gc2S (65,6 %), foi semelhante ao encontrado por DUARTE et al. (2004) para as frações de agaranas extraídas da alga *Acanthophora spicifera* (~ 65 %). Segundo os mesmos autores, o baixo rendimento das subfrações obtidas em DEAE sugere uma tendência dos polissacarídeos interagirem

com a coluna. A subfração Gc2S-c, eluída com NaCl 0,75 M foi a fração de maior rendimento (21,3 %).

As subfrações eluídas com soluções de NaCl em concentrações crescentes, apresentaram um aumento gradativo no teor de grupos *O*-sulfato. De outra forma, a subfração Gc2S-w, eluída com água, apresentou menos de 1 % de sulfato, o que pode justificar a sua não interação com a coluna. Todas as frações eluídas com NaCl apresentaram teores de proteína variando de 1,8 a 3,3 % e possuem teores de carboidrato variando de 50,2 a 64,9 %. Os valores de rotação óptica específica negativa obtidos para essas subfrações confirmam que a alga *G. cornea* biossintetiza apenas agaranas.

4.3.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

No espectro de infravermelho da subfração Gc2S-w (FIGURA 4.22) pode ser observado, embora em baixa intensidade, um pico na região de 1070 cm^{-1} correspondente ao esqueleto das galactanas. Contudo, não foi observado um perfil característico, como anteriormente obtido para as frações brutas e solúveis de *G. cornea*. A subfração Gc2S-w apresentou ausência do pico em 890 cm^{-1} , e quase nenhuma definição de picos na região de $1000\text{ a }700\text{ cm}^{-1}$. Também não foi observado absorvância na região de 930 cm^{-1} , relativa a unidades de 3,6-anidrogactose. A ausência dos picos em $1250\text{ e }1370\text{ cm}^{-1}$, relativos ao éster sulfato está de acordo com o baixo teor de sulfato ($< 1\%$ - TABELA 4.13).

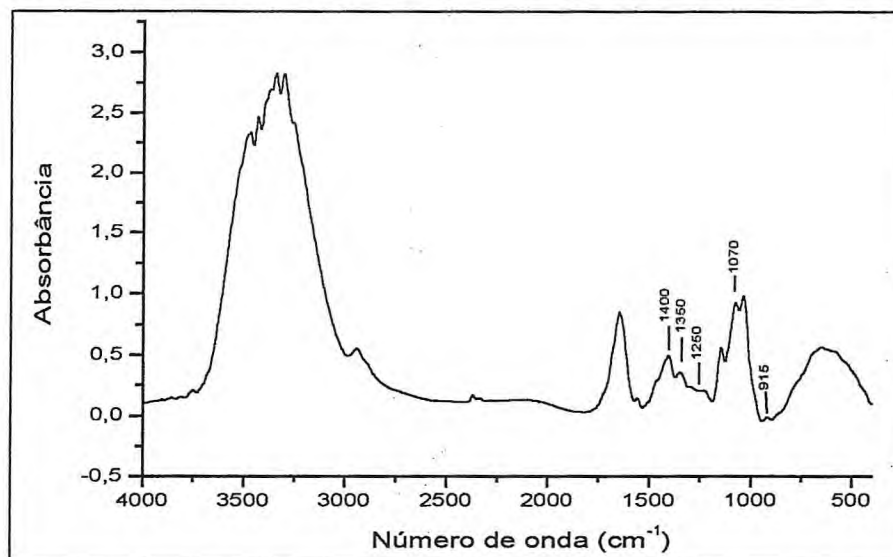


FIGURA 4.22. Espectro na região de infravermelho da fração Gc2S-w em pastilha de KBr.

A FIGURA 4.23 traz uma comparação dos espectros de infravermelho das subfrações Gc2S-a, Gc2S-b e Gc2S-c, na região de 1400 a 600 cm^{-1} .

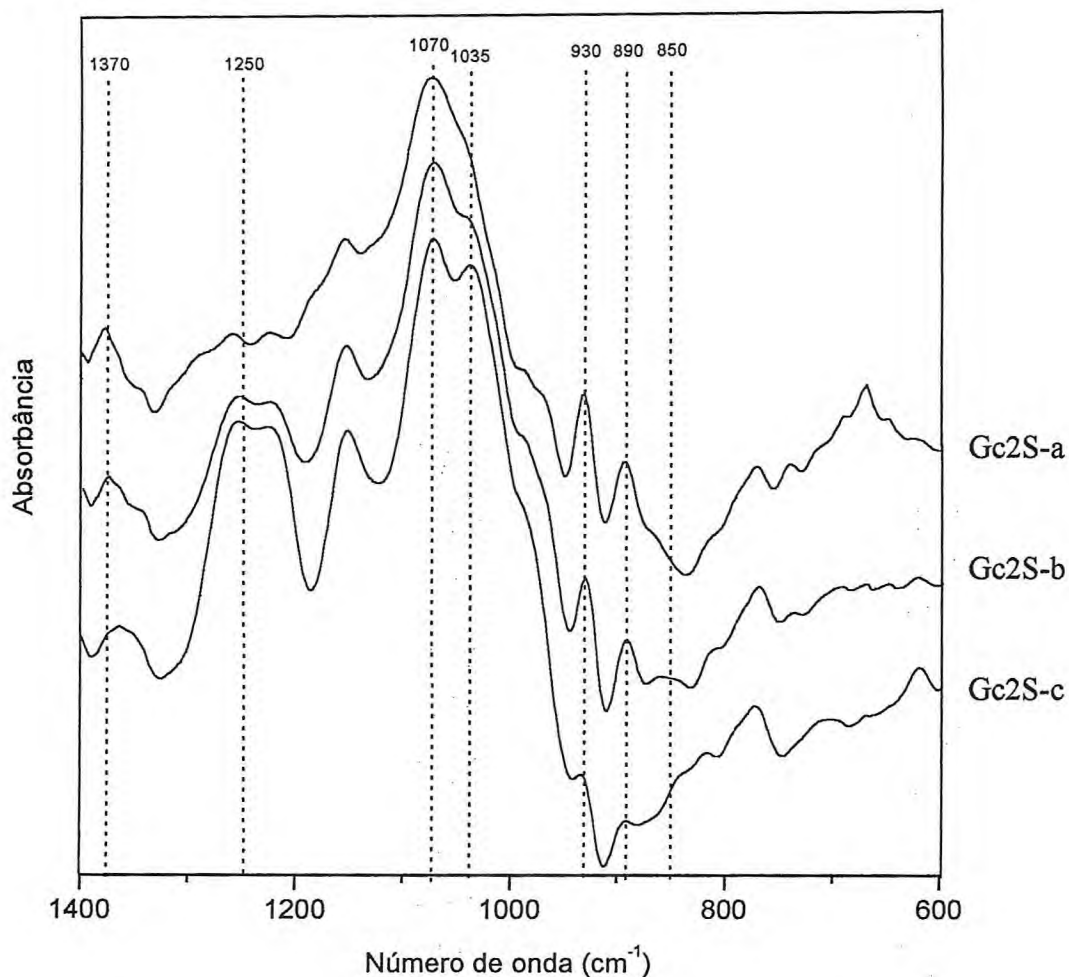


FIGURA 4.23. Espectros na região de infravermelho das subfrações Gc2S-a, Gc2S-b e Gc2S-c em pastilha de KBr.

As subfrações da FIGURA 4.23 apresentaram perfis semelhantes, com picos característicos de éster sulfato (1370 cm^{-1} e 1250 cm^{-1}), 1070 cm^{-1} relativo a galactanas, 930 cm^{-1} correspondente a 3,6-anidrogactose, e 890 cm^{-1} referente ao C-6 da β -galactose.

Um gradativo aumento na absorvância de 1250 cm^{-1} , com o aumento na concentração de NaCl foi correspondente aos teores de sulfato das subfrações Gc2S-a, Gc2S-b e Gc2S-c mostrados na TABELA 4.13. Uma correspondência inversa foi observada para as absorvâncias em 930 cm^{-1} , isto é, à medida que houve aumento no conteúdo de sulfato, houve decréscimo no pico em 930 cm^{-1} relativo a 3,6-anidrogactose.

4.3.3. Determinação da massa molar

As determinações das massas molares das subfrações obtidas por cromatografia de troca iônica da fração Gc2S, nos indicam diferenças significativas de massas molares entre a subfração eluída com água (Gc2S-w), com aproximadamente M_w de 645,6 g/mol (ou 646 Da), indicando ser um oligossacarídeo ou ainda o material ter sofrido uma possível degradação, e as outras subfrações eluídas com concentrações diferentes de NaCl, as quais apresentaram massas molares bem mais elevadas (com massas principais em torno de aproximadamente de 400 e 300 kDa – FIGURAS 4.24 a 4.26).

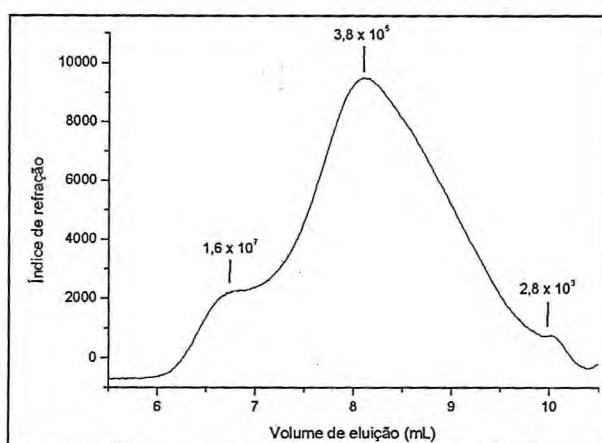


FIGURA 4.24. Cromatograma de GPC da subfração Gc2S-a.

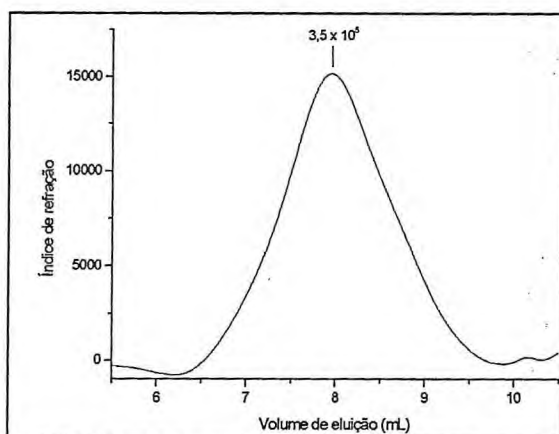


FIGURA 4.25. Cromatograma de GPC da subfração Gc2S-b.

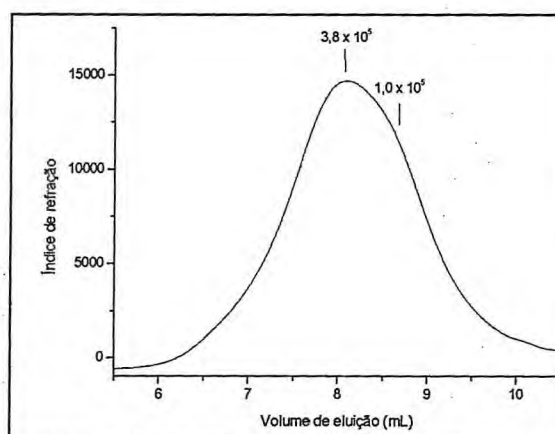


FIGURA 4.26. Cromatograma de GPC da subfração Gc2S-c.

A subfração Gc2S-a não se mostrou homogênea (FIGURA 4.24) e seu maior pico com volume de eluição de 8,1 mL indicou uma massa molar de $3,8 \times 10^5$ g/mol. Diferentemente, a subfração Gc2S-b mostrou um perfil homogêneo, com pico único em um volume de eluição de 7,9 mL, indicando massa molar de $3,5 \times 10^5$ g/mol. Por sua vez, a subfração Gc2S-c apresentou um pico com 8,1 mL, com massa molar semelhante ao principal pico da subfração Gc2S-a de $3,8 \times 10^5$ g/mol, e um discreto ombro com volume de eluição de 8,6 mL, de massa molar de $1,0 \times 10^5$ g/mol (TABELA 4.14). Em suma, as subfrações de Gc2S obtidas por cromatografia de troca iônica possuem em média, massas molares em torno de 10^5 g/mol.

Exames de amostras de agaroses comerciais por cromatografia de exclusão molecular (size-exclusion chromatography – SEC) e espalhamento de luz (low-angle laser light scattering – LALLS) têm indicado uma média de massa molar ente 80.000 a 140.000 g/mol. Murano, Toffanin e Zanetti (1992) caracterizaram o polímero de ágar, extraído de *Gracilaria dura*, em várias condições por SEC e LALLS, e relataram massas molares variando de 176.000 a 420.500 g/mol.

TABELA 4.14. Massa molar para cada pico das subfrações de polissacarídeos obtidos por DEAE-Sephacel.

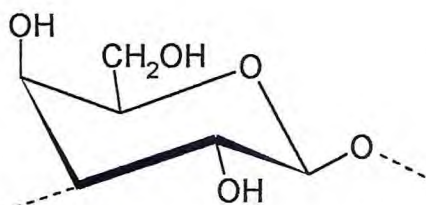
Subfrações	Picos	Volume de Eluição (mL)	Massa Molar (g/mol)
Gc2S-a	1	6,6	$1,6 \times 10^7$
	2	8,1	$3,8 \times 10^5$
	3	10,0	$2,8 \times 10^3$
Gc2S-b	1	7,9	$3,5 \times 10^5$
Gc2S-c	1	8,1	$3,8 \times 10^5$
	2	8,6	$1,0 \times 10^5$

O pico 1 da subfração Gc2S-a está fora do limite superior de exclusão da coluna que é de 10^6 g/mol, para os padrões de pululanas utilizados.

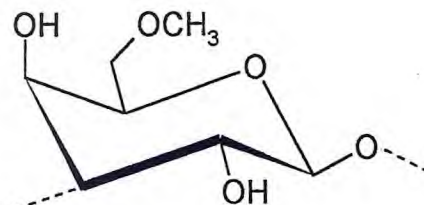
As massas molares, em negrito, para as subfrações Gc2S-a, Gc2S-b e Gc2S-c estão de acordo com as massas molares encontradas na literatura para agaranas.

Principais unidades monossacarídicas presentes na galactana Gc2S

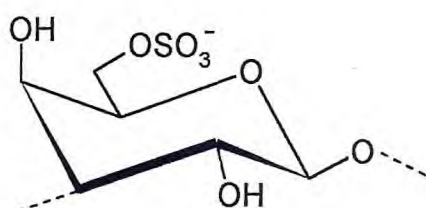
Unidades A



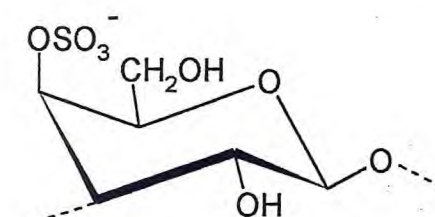
β -D-galactopiranoose



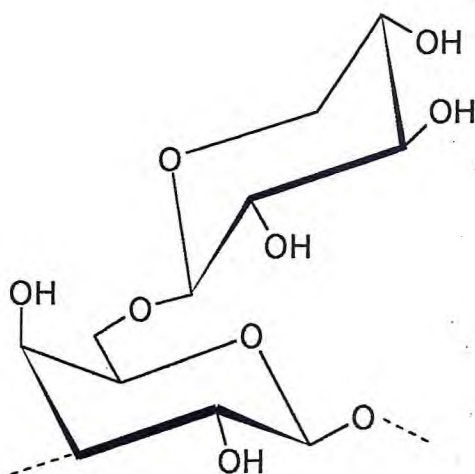
6-O-metil- β -D-galactopiranoose



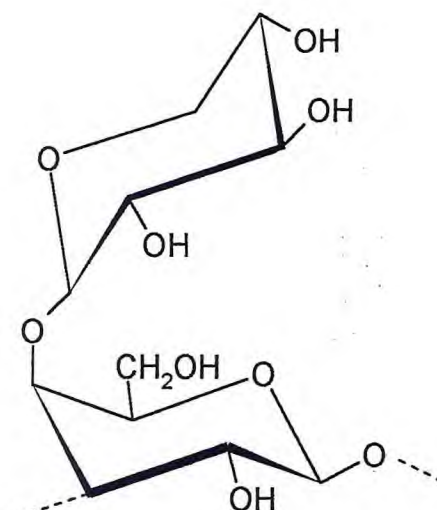
β -D-galactopiranoose-6-sulfato



β -D-galactopiranoose-4-sulfato

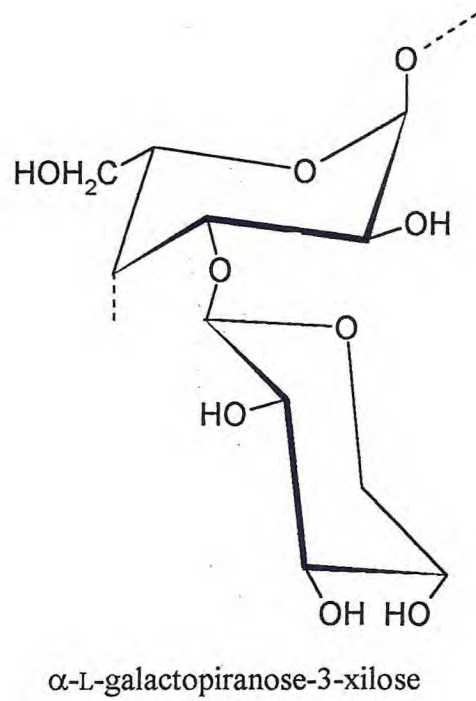
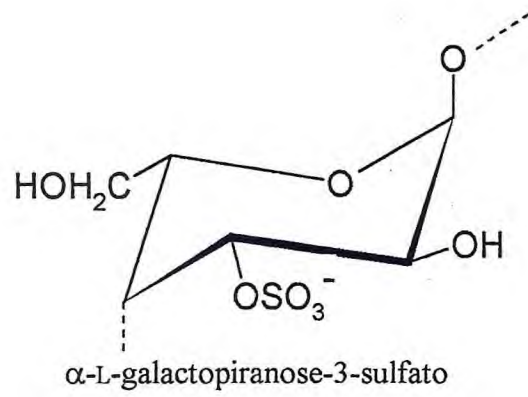
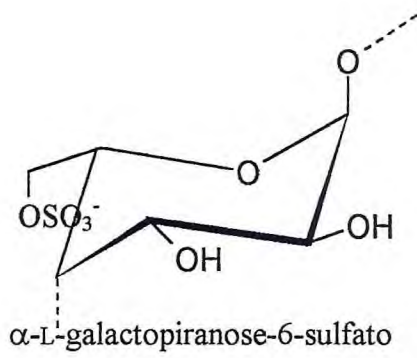
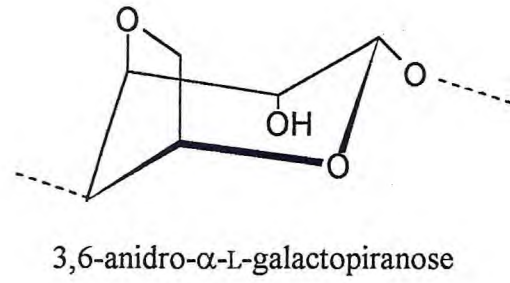
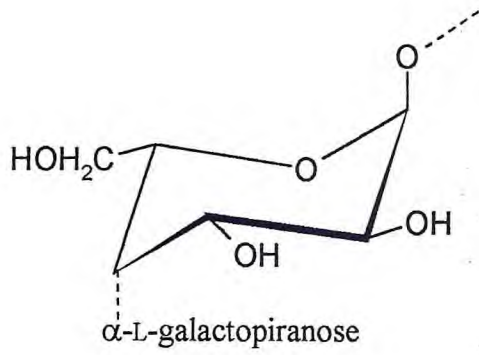


β -D-galactopiranoose-6-xilose



β -D-galactopiranoose-4-xilose

Unidades B



Parte 3

Estudos Químicos e Estruturais dos Polissacarídeos Sulfatados da Alga Marinha Vermelha *Agardhiella ramosissima*

Sumário

5. Materiais e Métodos
6. Resultados e Discussão

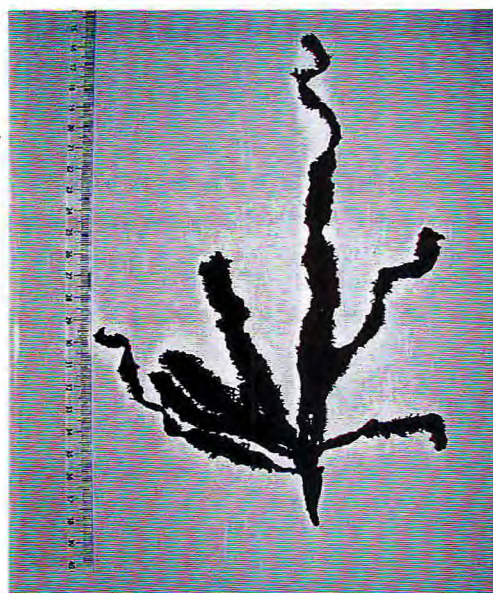
5. Materiais e Métodos

5.1. ALGA MARINHA – COLETA E PROCESSAMENTO

A alga marinha vermelha *Agardhiella ramosissima* (FIGURA 5.1) foi coletada arribada em mesolitoral na praia de Fleixeiras, Trairi-CE, em ocasião de maré de sizígia. Após a coleta, a alga foi lavada com água doce, livre de epífitas e estocada a -20 °C para posterior utilização.

O processamento de extração dos polissacarídeos iniciou-se com o descongelamento da alga (aproximadamente 320 g de alga fresca) e secagem ao sol ou em estufa a 25-30 °C. A alga seca (31,55 g) foi tratada com solução de hipoclorito de sódio 1 %, lavada exaustivamente com água corrente e destilada, e então submetida à extração dos polissacarídeos.

A alga foi classificada pela Profa. Silvia Maria Pita Guimarães do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo. Uma exsicata desta espécie foi depositada no Herbário Prisco Bezerra - EAC do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob o número 34.738.



Classificação:

Divisão - Rhodophyta

Ordem - Gigartinales

Família - Solieriaceae

Gênero - *Agardhiella*

Espécie - *Agardhiella ramosissima*

FIGURA 5.1. Fotografia da alga marinha vermelha *Agardhiella ramosissima* (Harv.) Kylin.

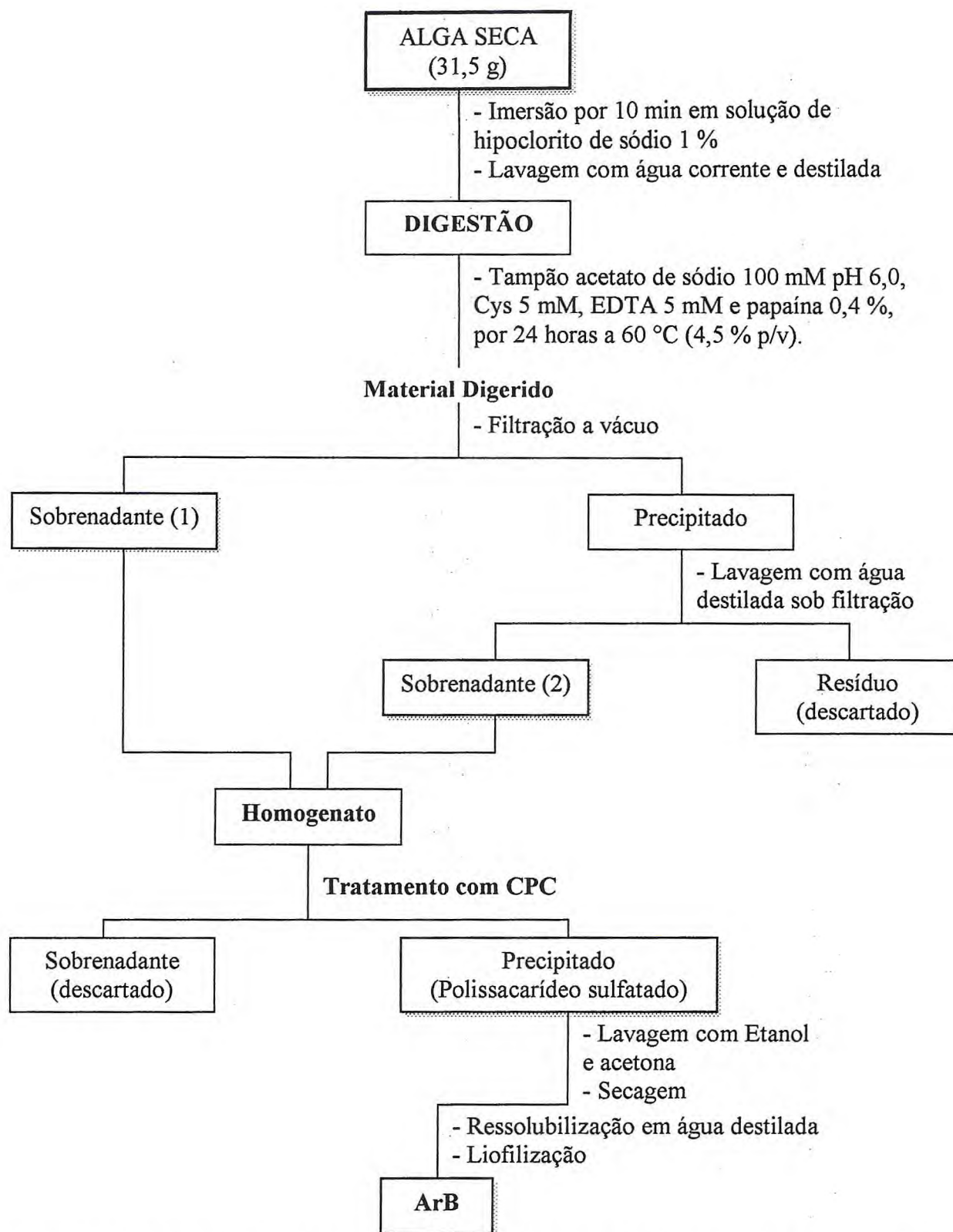
5.2. REAGENTES

Complexo borane-4-metil morfolina 97 %, DEAE-Sephadex, nitrato de prata, Albumina Sérica Bovina, Padrões de açúcares, Cloreto de cetilpiridínio (CPC) e Papaína foram obtidos de Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foi obtido da Merck, Darmstadt, Alemanha. Cisteína foi obtida da Riedel-de Haën, Alemanha. Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

5.3. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A alga seca (31,5 g) foi imersa numa solução de hipoclorito de sódio 1 % por 10 minutos para remoção de pigmentos. Após lavagem exaustiva com água corrente e por último com água destilada, a alga foi triturada em liquidificador e submetida à digestão enzimática em 700 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 6,0, contendo cisteína e EDTA 5 mM, papaína 0,4 %, por 24 horas a 60 °C (4,5 % - p/v). O material digerido foi filtrado a vácuo, e a ele adicionado a água de lavagem do resíduo para obtenção de maior rendimento. O volume final foi de 1650 mL. O homogenato foi tratado com 56,1 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) a 10 %, mantendo a mistura por 24 horas, à temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada (10.200 x g; 20 min; 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com aproximadamente 2 L de uma solução de CPC a 0,05 % e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O precipitado obtido foi submetido à solubilização em 500 mL de NaCl 2 M e etanol absoluto (100:15 v/v) para remoção do CPC solúvel em NaCl. Os polissacarídeos sulfatados precipitados, obtidos após centrifugação, foram lavados com aproximadamente 2 L de etanol absoluto e mantidos por 24 horas a 4 °C. O precipitado obtido por centrifugação (10.200 x g; 20 min; 4 °C) foi lavado com 2 L de acetona, centrifugado, seco a vácuo e ao ar livre. Após ressolubilização em água destilada (1 % - p/v) e liofilização, a fração bruta obtida foi denominada ArB (ESQUEMA 5.1).

Devido à falta de disponibilidade da alga *Agardhiella ramosissima*, pelos vários períodos sem acesso à sua coleta, não foi possível submetê-la ao protocolo de extração aquosa seriada, como adotado para a alga *Gracilaria cornea*.



ESQUEMA 5.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Agardhiella ramosissima* após tratamento enzimático e precipitação com CPC.

5.4. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *A. ramosissima* POR SOLUBILIZAÇÃO AQUOSA

Uma suspensão da fração bruta ArB a 0,2 % foi ressolubilizada em água destilada, deixando-se sob agitação à temperatura ambiente (25 °C) por 15 horas. Posteriormente, a suspensão foi submetida à centrifugação (15.200 x g, 20°C, 20 min) e o sobrenadante foi então liofilizado, originando a fração ArS.

5.5. PRECIPITAÇÃO FRACIONADA COM KCl

A fração solúvel ArS foi submetida à precipitação fracionada com KCl (CEREZO, 1967). O material foi solubilizado em água destilada (0,25 % p/v) à temperatura ambiente sob agitação mecânica. Cloreto de potássio sólido foi adicionado lentamente sob agitação mecânica de modo a fornecer uma solução de concentração desejada (até 0,1 M). A solução foi mantida sob agitação mecânica por mais 2 horas, deixada em repouso por aproximadamente 24 horas, a 4 °C e centrifugada (13600 x g; 20 min, 4 °C). Porém não foi observada a presença de precipitado nesta faixa de concentração. Então, foram feitas adições seqüenciais de KCl aumentando a concentração até 0,2 M (sem precipitação), até 0,3 M (ainda sem precipitação). Com a adição de até 0,4 M, ocorreu a formação de precipitado, sendo este denominado como a fração ArK-a. Com a adição de até 0,8 M não ocorreu precipitação. Aumentando-se a concentração de KCl até 1,0 M obteve-se a fração ArK-b e até 1,5 M a fração ArK-c. Os polissacarídeos que permaneceram solúveis nesta última adição de KCl (até 2 M) constituíram a fração denominada ArK-d. O precipitado obtido após cada adição de KCl foi dialisado exaustivamente contra água destilada. Nitrato de prata foi utilizado para detectar cloreto na água de diálise. O material foi posteriormente liofilizado. No caso da fração ArK-d (solúvel em KCl 2 M) o material foi concentrado, dialisado e liofilizado.

5.6. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

As metodologias empregadas para as dosagens de sulfato, proteína, carboidrato e determinação da rotação óptica nas frações polissacarídicas da alga *Agardhiella ramosissima*, foram as mesmas utilizadas para as frações polissacarídicas da alga *Gracilaria cornea*, e estão descritas nos itens 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3 e 3.6.4, respectivamente, nas páginas 64 e 65.

5.7. HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL

Para determinação da composição monossacarídica das frações obtidas a partir da alga vermelha *A. ramosissima*, utilizou-se hidrólise reductiva de acordo com Stevenson e Furneaux (1991), descrita no item 3.7, página 66.

5.8. DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

A preparação do sal de piridônio e o processo de solvólise da fração solúvel ArS foi o mesmo utilizado para as frações Gc2 e Gc2S, descritos nos itens 3.9.1 e 3.9.2, página 67.

5.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

As análises por cromatografia líquido-gasosa (CLC) e cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-EM), bem como cromatografia de permeação em gel (GPC) foram realizadas segundo descrito nos respectivos itens 3.12.1, 3.12.2 e 3.12.3, páginas 70 e 71.

5.10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

As análises de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C) e as análises espectroscópicas na região do infravermelho das frações de *A. ramosissima* foram realizadas de acordo como descrito nos itens 3.13.1 e 3.13.2, páginas 71 e 72.

6. Resultados e Discussão

6.1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA DE *Agardhiella ramosissima*

6.1.1. Extração e rendimento

A alga marinha vermelha *Agardhiella ramosissima*, pertencente à ordem Gigartinales, foi submetida à extração de polissacarídeos sulfatados como descrito por Melo (2001).

Após a imersão em solução de hipoclorito de sódio 1 % e lavagem exaustiva com água corrente e água destilada, a alga triturada foi submetida à digestão enzimática em tampão acetato de sódio 100 mM pH 6,0, contendo cisteína e EDTA 5 mM, papaína 0,4 %, por 24 horas a 60 °C. O material digerido foi filtrado a vácuo, e posteriormente tratado com soluções de CPC para precipitação da fração de carboidrato sulfatado. O precipitado obtido foi submetido à solubilização em NaCl 2 M e etanol para remoção do CPC solúvel em NaCl. Esta fração de polissacarídeo sulfatado bruto foi lavada com soluções de etanol e acetona, para remoção de excesso de enzimas, seca a vácuo e ao ar livre. Após ressolubilização em água destilada e liofilização, a fração bruta obtida foi denominada ArB, representando 15,6 % do material inicial (ESQUEMA 5.1 na pág 117).

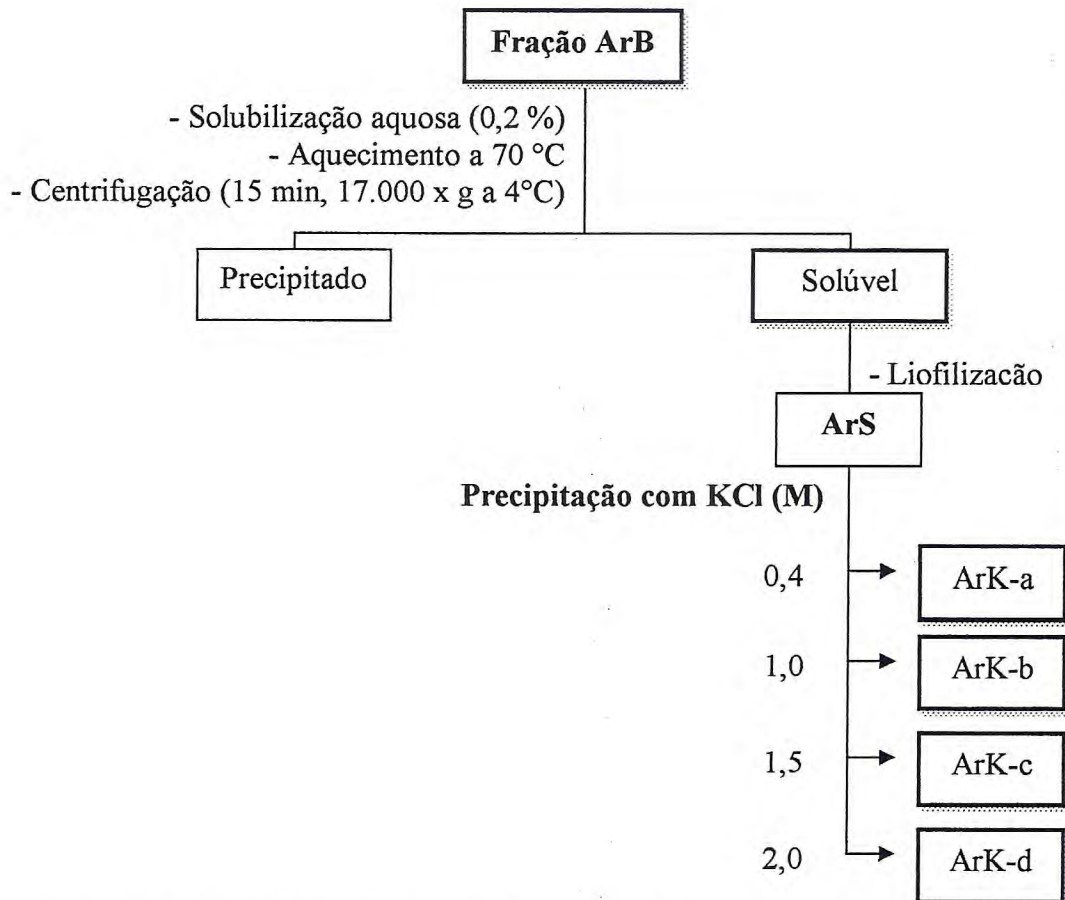
Esquema de extração semelhante foi utilizado por Farias et al. (2000), para a obtenção da galactana de *Botryocladia occidentalis* (Rhodophyta, Rhodimoniales), com aproximadamente 4 % de rendimento total.

A alga marinha *Agardhiella subulata* apresentou um rendimento total de 24 % de polissacarídeos sulfatados. A sua extração foi conduzida de maneira seriada, à temperatura ambiente (6 vezes), a 85 °C (3 vezes) e a 120 °C (2 vezes - MURANO et al., 1997). Esse procedimento de extração pode justificar a obtenção de um rendimento superior ao encontrado para o presente trabalho, pois como discutido para a extração de polissacarídeos de algas do gênero *Gracilaria*, além de outras variáveis ambientais ou fisiológicas, o protocolo de extração adotado é mais um parâmetro que influencia os valores de rendimentos que podem ser obtidos.

6.2. PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO BRUTO DE *Agardhiella ramosissima* (ArB) POR SOLUBILIZAÇÃO AQUOSA

6.2.1. Obtenção e análise química

Por apresentar elevada turbidez quando em solução, a fração bruta ArB foi submetida ao fracionamento por solubilização aquosa, com a finalidade de separar esses componentes insolúveis. Usando a mesma metodologia para os polissacarídeos de *G. cornea*, a fração ArB foi ressolubilizada em água (0,2 %) e mantida sob aquecimento (70 °C) até completa solubilização (15 horas - ESQUEMA 6.1). A fração foi mantida a temperatura ambiente até atingir 25 °C, centrifugada, liofilizada, originando a fração ArS com 66,2 % de rendimento em termos de material solúvel recuperado (TABELA 6.1).



ESQUEMA 6.1. Purificação e fracionamento dos polissacarídeos obtidos da alga *Agardhiella ramosissima*.

TABELA 6.1. Rendimento, análise química e rotação óptica da fração ArS de *Agardhiella ramosissima*.

Fração ^a	Rendimento ^b	Carboidrato (%)	Sulfato NaSO ₃ (%)	Proteína (%)	[α] _D
ArS	66,2	69,5	27,2	tr.	+ 33,0

a = fração solúvel em meio aquoso de ArB, a 0,2 %.

b = rendimento expresso em termos do material recuperado após fracionamento aquoso.

tr. = traços (< 1 %).

A fração ArS apresentou alto conteúdo de sulfato (27,2 % - TABELA 6.1), característico para polissacarídeos tipo carragenana, os quais são geralmente mais sulfatados que as agaranas (LAHAYE, 2001). O grau de substituição por grupos sulfato varia nas algas da ordem Gigartinales, porém, valores muito próximos são obtidos para as galactanas de um mesmo gênero. No gênero *Callophycus* os grupos sulfato estão presentes entre 15,9 – 16,8 % (CHIOVITTI et al., 1997) e algas do gênero *Erythroclonium* apresentaram grupos sulfato entre 19,3 – 20,9 % (CHIOVITTI et al., 1998). Ainda na família Solieriaceae, a alga *Meristotheca procumbens* apresentou 15,4 % de sulfato (PRASAD et al., 2001), enquanto que a alga *Kappaphycus alvarezii* apresentou variação de grupos sulfato entre 15,5 – 26,1 % (ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2000).

Embora a extração dos polissacarídeos sulfatados, pelo emprego de digestão enzimática e precipitação com CPC, não forneça um rendimento máximo de gel por ocorrer apenas em uma etapa, a fase de hidrólise proteolítica pode, por sua vez, fornecer um polissacarídeo com conteúdo menor de proteína. Como pode ser observado na TABELA 6.1, a fração ArS apresentou conteúdos protéicos abaixo de 1 %, enquanto que a alga *Gymnogongrus griffithsiae*, pertencente à ordem Gigartinales, submetida a extrações aquosas seriadas, apresentou frações com teores de proteína variando de 3,6 a 23,4 % (FARIA, 2002).

É provável que agaranas e carragenanas, que existem como componentes da matriz intercelular de algas, sejam ligados covalentemente a porções protéicas, isto é, sejam proteoglicanos. Algumas, mas não todas as proteínas, podem ser removidas por extração alcalina dos polissacarídeos de algas. Agaranas e carragenanas geralmente apresentam nitrogênio. Tem sido sugerido que o aumento da força do gel de ágar e carragenana pelo

tratamento alcalino pode ser em parte devido à remoção da porção protéica, produzindo assim um polímero mais regular, um mecanismo já muito bem aceito de “arrumação” da cadeia polissacarídica (STANLEY, 1995).

O valor de rotação óptica encontrado para ArS ($[\alpha]_D = + 33,0^\circ$ - TABELA 6.1) foi mais baixo que os valores reportados para κ/ι -carragenanas ($[\alpha]_D = + 56,1$ até $+ 66,5^\circ$) ou parcialmente ciclizada μ/ν -carragenanas ($[\alpha]_D = + 55,1^\circ$ - STORTZ; CERZO, 1993). Estevez, Ciancia e Cerezo (2000) atribuíram os valores baixos de rotação óptica obtidos para as frações de *Kappaphycus alvarezii* ($[\alpha]_D = + 12,0^\circ$ até $+ 34,1^\circ$) à presença de L-galactose nessas frações.

Ainda que grande parte das algas pertencentes à ordem Gigartinales seja conhecida como típicas produtoras de carragenanas, várias publicações têm demonstrado que além de carragenanas, espécies desta ordem também sintetizam agaranas e/ou galactanas do tipo híbrida D/L. Estevez, Ciancia e Cerezo (2001, 2004) isolaram de *Kappaphycus alvarezii* carragenanas do tipo kappa, agaranas e híbridos D/L. De *Gymnogongrus griffithsiae*, Faria (2002) isolou carragenanas do tipo iota/kappa/nu e híbridos D/L. Resultado similar foi obtido com outra espécie *G. torulosus* (ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2001), estes autores isolaram frações contendo estruturas típicas de kappa-carragenanas, mas com significativa percentagem de açúcares pertencentes à série estereoquímica L-, além de agaranas. Deste modo, mesmo algas anteriormente consideradas típicas produtoras de carragenanas também sintetizam galactanas do tipo agarana e/ou do tipo híbrida D/L, demonstrando que a alga não pode ser classificada como uma típica carragenófito. Galactanas híbridas D/L apresentam rotação ópticas específicas intermediárias entre os valores de carragenanas e de agaranas, de forma dependente com a percentagem de monossacarídeos da série D- e L-.

Sendo assim, o valor da rotação óptica específica observada para a fração ArS de *A. ramosissima* ($+ 33,0^\circ$) sugere a presença de galactana híbrida D/L e/ou uma mistura de agaranas e carragenanas.

6.2.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O espectro de infravermelho da fração ArS (FIGURA 6.1) apresentou absorbâncias bem definidas em 1370 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} referentes ao grupo sulfato, em 930 cm^{-1} referente à unidade 3,6-anidrogactose, e em 850 cm^{-1} e 705 cm^{-1} correspondentes à unidade β -D-galactose-4-sulfato, indicando ser uma carragenana da família kappa. A absorbância em 805 cm^{-1} , correspondente à unidade 3,6-anidrogactose-2-sulfato, indica que a fração ArS é composta predominantemente por iota-carragenana.

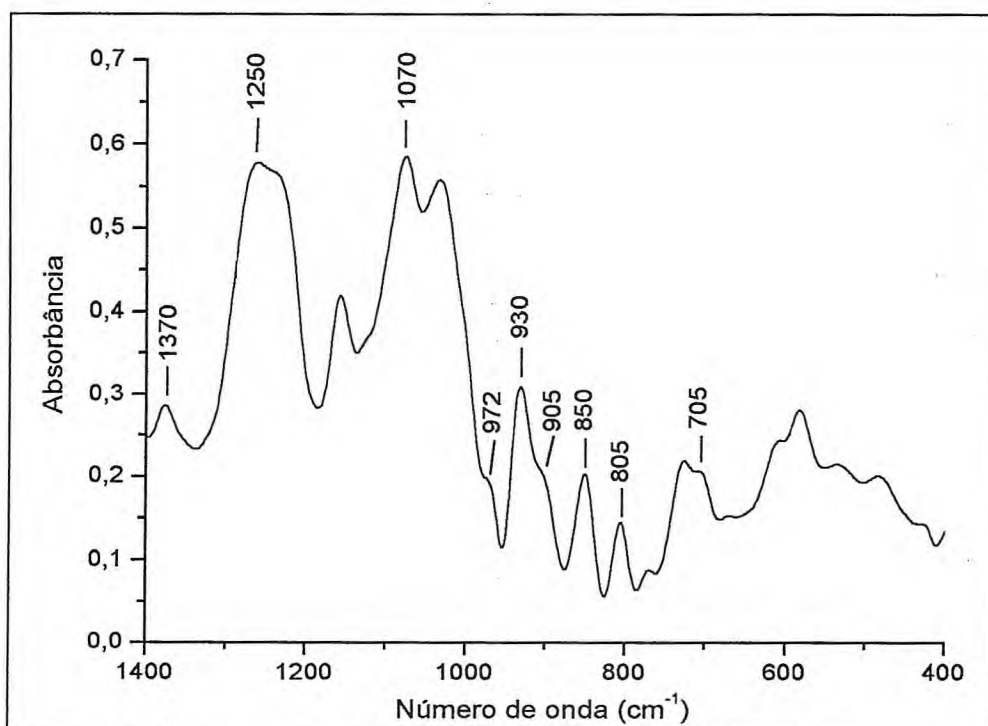


FIGURA 6.1. Espectro na região do infravermelho da fração ArS em pastilha de KBr.

O ombro observado em 972 cm^{-1} é atribuído à presença de uma “variante” da iota-carragenana, denominada de omicron-carragenana, a qual possui a unidade β -D-galactose-4-sulfato ligada à unidade α -D-galactose-2-sulfato (CHOPIN; WHALEN, 1993; ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO 2000). O outro ombro observado em $900\text{-}905\text{ cm}^{-1}$ sugere a presença da unidade β -D-galactose não sulfatada e/ou seu derivado 6-O-metil (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO 2000).

6.2.3. Determinação da massa molar

Diversas análises de GPC (FARIA, 2002; GREEN; YAPHE, 1984; MELO 2001; ZIBETTI, 2001) têm mostrado que as carragenanas nativas possuem um caráter heterogêneo e, portanto são polidispersas. Na maioria das análises tem sido encontrada variação de massa molar de $10^5 - 10^6$ g/mol, e ainda uma “cauda” de baixa massa molar em torno de 10^3 . As carragenanas do tipo iota, kappa e lambda apresentam em geral uma variação de massa molar típica de 300.000 a 600.000 g/mol (PICULELL, 1995).

A distribuição da massa molar da fração solúvel ArS foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC), com emprego de pululanas como padrão de calibração da cromatografia. O perfil cromatográfico da distribuição de massa molar da fração ArS (FIGURA 6.2) indicou um ombro com volume de eluição de 6,51 mL, com massa molar de $7,8 \times 10^6$ g/mol, provavelmente devido a agregações que ocorrem nas cadeias polissacarídicas. O pico mais proeminente foi observado em um volume de eluição de 7,59 mL, com massa molar de $7,4 \times 10^5$ g/mol. A fração ArS ainda apresentou contaminante de baixa massa molar ($2,4 \times 10^3$ g/mol).

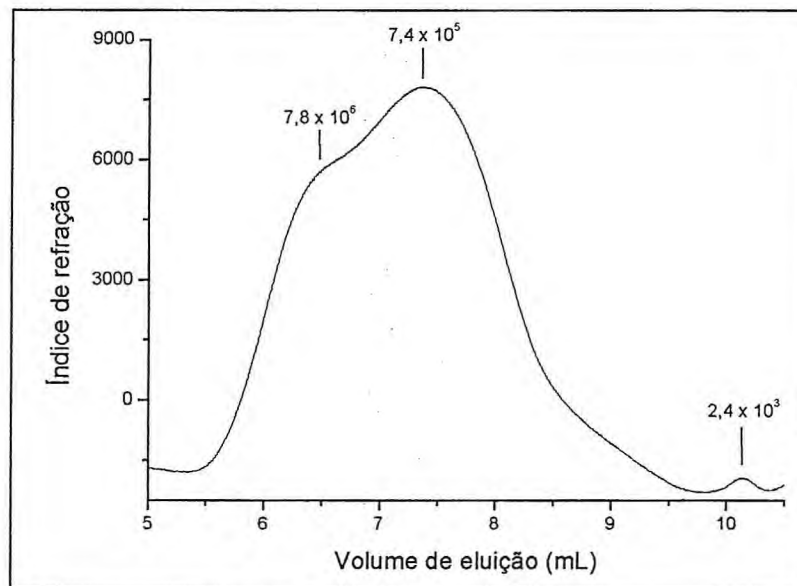


FIGURA 6.2. Cromatograma de GPC da fração solúvel ArS.

6.2.4. Composição monossacarídica

Utilizando o processo de hidrólise redutiva descrito por Stevenson e Furneaux (1991) foi possível quantificar conjuntamente por análise de CLG as unidades de anidrogactose, além das outras unidades monossacarídicas. A análise de composição monossacarídica da fração ArS da alga *Agardhiella ramosissima* (TABELA 6.2) mostrou a presença de galactose (44,8 mol %), 3,6-anidrogactose (23,8 mol %), e baixas quantidades de 6-*O*-metil-galactose (4,5 mol %). Baseado nos dados de CLG, a fração ArS ainda apresentou grande conteúdo de glucose (26,9 mol %), originária do carboidrato de reserva das algas vermelhas, amido das florídeas.

TABELA 6.2. Composição monossacarídica da fração ArS da alga *A. ramosissima*.

Fração	Monossacarídeos ^a (mol %)			
	3,6 AnGal ¹	6OMeGal ²	Gal ³	Glc ⁴
ArS	23,8	4,5	44,8	26,9

a = na forma de acetato de alditóis, por CLG (STEVENSON; FURNEAUX, 1991);

1, 2, 3 e 4 = abreviatura dos monossacarídeos (3,6AnGal = 3,6-anidrogactose; 6MeGal = 6-*O*-metilgalactose; Gal = galactose e Glc = glucose).

A presença de glucose foi confirmada por análise de RMN de ¹³C (FIGURA 6.3), pelo deslocamento químico na região anomérica em 99,7 ppm, correspondente ao seu C-1. Outros sinais atribuídos aos carbonos do anel da glucose foram observados em 73,4 e 71,4 ppm, correspondentes aos seus C-3 e C-5. Esses valores foram assinalados de acordo com van de Velde et al. (2002).

Pela análise de RMN de ¹³C, o amido extraído junto com a fração polissacarídica obtida por autoclavagem a 120 °C por 1 hora, da alga *Agardhiella subulata*, teve, na região anomérica, seu C-1 assinalado em 100,4 ppm. Junto com as análises de RMN, as análises de FT-IR mostraram que as frações obtidas a 85 °C e à temperatura ambiente tinham uma similaridade estrutural, com característica de gel típico de carragenana com um domínio da estrutura repetitiva de iota-carragenana (MURANO et al., 1997).

O espectro de RMN de ^{13}C da fração ArS também mostra os deslocamentos químicos na região anomérica em 101,8 e 91,7 ppm correspondentes à β -D-galactose-4-sulfato ligada à 3,6-anidro- α -D-galactose-2-sulfato, sendo esta díade representativa da estrutura da iota-carragenana, corroborando com a indicação obtida pelo espectro de FT-IR.

A TABELA 6.3. apresenta os deslocamentos químicos observados para a fração ArS, tendo como base os assinalamentos referidos por Falshaw et al. (1996).

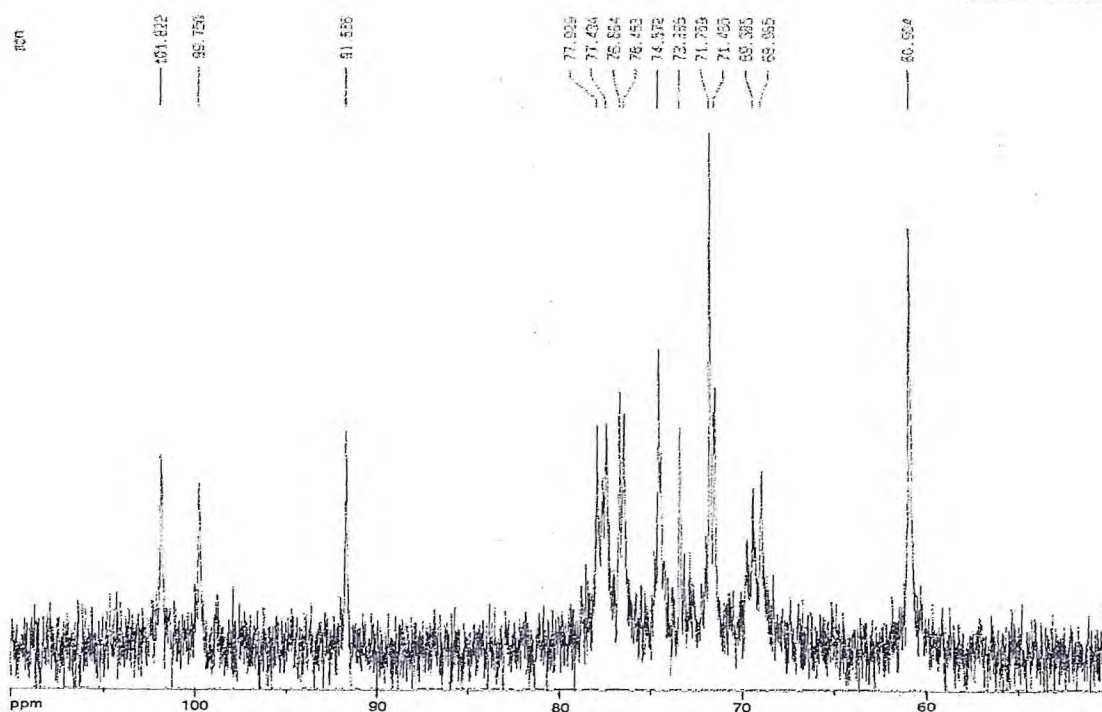


FIGURA 6.3. Espectro de RMN de ^{13}C da fração ArS.

TABELA 6.3. Assinalamentos químicos de RMN de ^{13}C para a fração ArS.

Carragenana ^a		Unidade	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G4S	Observado	A	101,8	68,9	76,4	71,8	74,4*	60,9
	Referido ^b	A	102,2	69,3	76,8	72,2	74,8	61,3
DA2S	Observado	B	91,7	74,6	77,4	77,9	76,6	69,4
	Referido ^b	B	92,1	75,0	77,8	78,3	77,0	69,8

a = G4S: β -D-galactose-4-sulfato; DA2S: 3,6-anidro- α -D-galactose-2-sulfato.

b = FALSHAW et al., 1996.

* = assinalamento ausente no espectro provavelmente por estar sobreposto.

6.2.5. Dessulfatação solvolítica (solvolise) da fração ArS

Para a remoção dos grupos sulfato, a galactana ArS foi submetida (na forma de sal de piridônio) a tratamento com uma mistura reativa (DMSO:metanol:piridina) e aquecimento (100 °C) por 4 horas, como descrito em Materiais e Métodos (itens 3.9.1 e 3.9.2).

O ambiente ácido favorável à dessulfatação pode produzir também uma depolimerização do material, bem como outras degradações. Um dos solventes usados como preventivos da degradação é a piridina, pois é capaz de controlar as concentrações de íons de hidrogênio reativos (MILLER; BLUNT, 1998). No processo solvolítico, o grupamento sulfato é removido na forma de SO_3 e complexa com o metanol, considerado como “catalisador” da reação (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

A fração ArS (27,2 % de NaSO_3) após tratamento solvolítico (ArS-D) apresentou 13,8 % de NaSO_3 , ou seja, apenas 49,3 % de dessulfatação, com 44,5 % de rendimento.

Muito embora o procedimento de dessulfatação da fração ArS não tenha ocorrido totalmente, pode-se constatar pela comparação dos espectros de infravermelho da fração ArS-D com o da fração nativa (ArS), a perda do sulfato em C-2 da unidade 3,6-anidro-D-galactose da fração ArS-D pela ausência da absorbância em 805 cm^{-1} , e conseqüente redução na absorbância em 1250 cm^{-1} referente ao éster sulfato (FIGURA 6.4).

Ainda na FIGURA 6.4, pode ser observada a absorbância em $850\text{-}845\text{ cm}^{-1}$, característica de kappa-carragenana, mesmo que a sua atenuação possa significar uma perda de parte de sulfato em C-4 da unidade β -D-galactose-4-sulfato. A banda em 890 cm^{-1} , relativa ao C-6 da unidade β -D-galactose, que não havia sido observada na fração nativa, surgiu logo após o tratamento solvolítico. É provável que seu aparecimento se deva à dessulfatação parcial das unidades de β -D-galactose-4-sulfato. Houve também uma diminuição na absorbância de 930 cm^{-1} , referente a 3,6-anidrogalactose, e uma melhor definição no pico em 972 cm^{-1} , o qual é referido à omicrom-carragenana, composta por unidades β -D-galactose ligadas a α -D-galactose-2-sulfato. Essas duas ultimas situações ($\downarrow 930\text{ cm}^{-1}$ e $\uparrow 972\text{ cm}^{-1}$) também podem significar alguma perda das unidades 3,6-anidrogalactose.

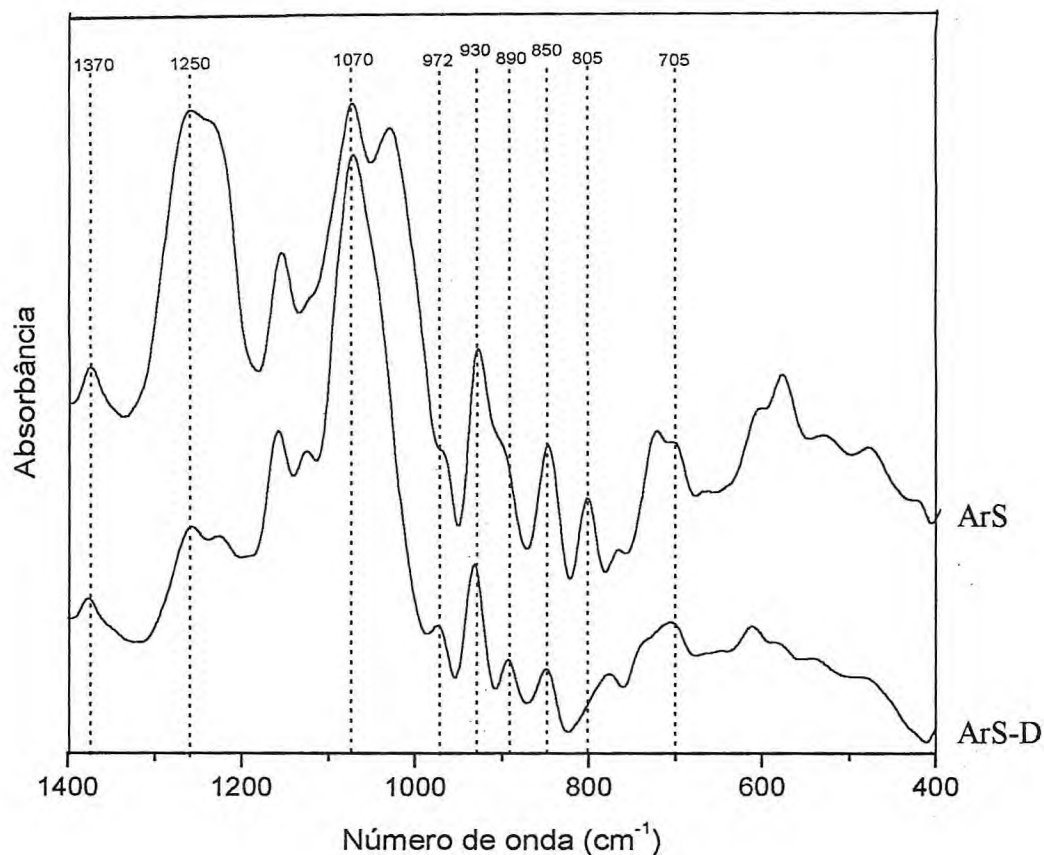


FIGURA 6.4. Espectros na região de infravermelho das frações ArS e ArS-D em pastilha de KBr.

Quando Miller e Blunt (1998) examinaram a dessulfatação de algumas galactanas, observaram que os resíduos anidrogactose eram particularmente mais susceptíveis à hidrólise, e que a dessulfatação da iota-carragenana parece ocorrer essencialmente passo a passo, na seqüência $\text{iota} \rightarrow \text{kappa} \rightarrow \text{beta-carragenana}$. Ao final de cada hidrólise, nenhuma mistura contendo as três carragenanas foi encontrada. Essa seqüência indica primeiramente a remoção do sulfato em C-2, para em seguida ser removido o sulfato em C-4. De acordo com seus experimentos, observaram ainda que a dessulfatação não chegava a 100 %, mesmo com aumento de temperatura e/ou tempo de catálise. Presumivelmente o SO_3 , ou outro produto da reação, estaria inibindo a catálise, ou ainda estaria havendo uma resulfatação durante o processo. Dessa forma, a escolha de um bom acceptor que reaja irreversivelmente com o SO_3 é extremamente necessário para uma dessulfatação eficiente.

6.3. FRACIONAMENTO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO SOLÚVEL DE *Agardhiella ramosissima* (ArS) POR PRECIPITAÇÃO COM CLORETO DE POTÁSSIO (KCl)

6.3.1. Obtenção e análise química

Segundo Greer e Yaphe (1984), estudos prévios têm mostrado a existência de carragenanas híbridas naturais, e é muito provável que homopolímeros contendo somente um tipo de dissacarídeo repetitivo possam não existir na natureza.

Com base nisso, e levando-se em conta a contaminação por glucose e o valor de rotação óptica ter sido intermediário entre os valores de kappa-carragenanas e agaranas (+ 53,6 ° e - 23,4 °, respectivamente – STANLEY, 1995), a fração ArS foi submetida à precipitação fracionada com KCl. Este tratamento baseia-se na propriedade de geleificação de carragenanas, a qual é dependente do teor de grupos sulfato e de 3,6-anidrogactose. Carragenanas com maior teor de 3,6-anidrogactose e menor percentagem de grupos sulfato tendem a geleificar em menores concentrações de KCl.

Esta metodologia de fracionamento foi primeiramente descrita por Cerezo (1967), que realizou o fracionamento de um sistema de galactanas da alga *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales). Deste modo, foram isoladas diversas frações que precipitavam em concentrações diferentes de KCl.

Portanto, a precipitação salina, em especial com íons potássio devido à alta “afinidade” apresentada pelas carragenanas da família kappa a esse sal, vem sendo empregada usualmente para a obtenção de frações de carragenanas mais homogêneas (PICULELL, 1995).

A fração ArS foi solubilizada em água destilada na concentração de 0,25 % e tratada com KCl até a concentração final de 2 M. Após cada adição de KCl, os polissacarídeos precipitados, obtidos por centrifugação foram dialisados exaustivamente contra água destilada e liofilizados. Foram obtidas as subfrações ArK-a (precipitada com KCl na concentração de 0,3-0,4 M), ArK-b (0,8-1,0 M), ArK-c (1,0-1,5 M), ArK-d (solúvel em 2 M). O rendimento e a faixa de precipitação de cada subfração está mostrado na TABELA 6.4.

TABELA 6.4. Rendimento das subfrações de ArS obtidas após fracionamento com KCl.

Faixa de Fracionamento KCl (M)	Fração	Massa (mg)	Rendimento (%) ^b	Rendimento Relativo (%) ^c
0,3-0,4	ArK-a	53,3	21,3	27,6
0,8-1,0	ArK-b	106,3	42,5	55,0
1,0-1,5	ArK-c	14,6	5,8	7,5
2,0 ^a	ArK-d	19,3	7,7	9,9

a = subfração solúvel em KCl 2 M.

b = rendimento em relação ao peso inicial de ArS (250mg).

c = rendimento relativo à recuperação de 77,3 %.

Como pode ser observado na TABELA 6.4, na concentração de 0,8-1,0 M (subfração ArK-b) houve a precipitação de quase 50 % das galactanas presentes no polissacarídeo solúvel (ArS).

Recentemente, Estevez, Ciancia e Cerezo (2000, 2004) utilizaram fracionamento com KCl dos polissacarídeos sulfatados da alga *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Solieriaceae) com a obtenção de carragenanas com padrão kappa, pequenas quantidades de carragenanas de baixa massa molar e ainda agaranas. A alga *Gymnogongrus torulosos* (Gigartinales, Phyllophoraceae), também submetida ao fracionamento com KCl, demonstrou sintetizar galactanas híbridas D/L (ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2001). Faria (2002) obteve frações de *Gymnogongrus griffithsiae* pelo mesmo fracionamento, constituídas principalmente por carragenanas híbridas iota-kappa-nu e galactanas híbridas D/L.

A análise de composição monossacarídica por cromatografia líquida gasosa (CLG) na forma de acetatos de alditóis demonstrou que quase a totalidade da glucose foi precipitada com KCl na concentração de 0,3-0,4 M (subfração ArK-a). As demais subfrações, ArK-b, ArK-c e ArK-d, apresentaram galactose e 3,6-anidrogactose como principais monossacarídeos. Pequena quantidade de galactose monometilada também foi observada em todas as subfrações. A subfração ArK-d apresentou também pouca quantidade de glucose (6,0 mol %), e da mesma forma que na subfração ArK-a, ainda foram detectadas baixas quantidades de xilose (TABELA 6.5).

TABELA 6.5. Análise química, rotação óptica e composição monossacarídica das subfrações de ArS obtidas após fracionamento com KCl.

Frações	Sulfato NaSO ₃ (%)	Proteína (%)	Carboidrato (%)	[α] _D	Monossacarídeos (mol %) ^a				
					3,6 AnGal ¹	Xil ²	6MeGal ³	Gal ⁴	Glc ⁵
ArK-a	4,7	7,8	77,9	n.d.	4,0	2,8	4,4	8,6	80,2
ArK-b	32,5	-	63,4	+ 23,0	38,2	-	4,2	57,6	-
ArK-c	28,0	1,0	62,9	+ 19,0	35,3	-	3,3	61,4	-
ArK-d	23,2	1,0	75,8	- 12,0	17,6	3,2	2,0	74,4	6,0

a = na forma de acetato de alditóis, por CLG (STEVENSON; FURNEAUX, 1991).

1, 2, 3, 4 e 5 = abreviatura dos monossacarídeos (3,6AnGal = 3,6-anidrogactose; Xil = xilose; 6MeGal = 6-O-metilgalactose; Gal = galactose e Glc = glucose).

- = não detectado.

n.d. = não determinado.

Como ainda pode ser observado na TABELA 6.5, com exceção da subfração ArK-a, que é constituída majoritariamente por glucose (80,2 mol %), as carragenanas com maiores teores de 3,6-anidrogactose e altos teores de sulfato foram precipitadas com concentrações de 1,0 e 1,5 M de KCl (ArK-b e ArK-c).

Segundo Painter (1983), a insolubilidade de frações de carragenanas em soluções de cloreto de potássio é devida à formação de ligações intermoleculares, usando “pontes de sais” entre as cadeias. Os íons potássio se ligam aos grupos sulfato, neutralizando as cargas negativas, diminuindo assim, a repulsão e conseqüentemente favorecendo o processo de geleificação. As unidades de 3,6-anidrogactose também favorecem a formação de hélices entre as cadeias polissacarídicas, o que aumenta o poder de geleificação. Como conseqüência das cargas neutralizadas, quanto maior a quantidade de 3,6-anidrogactose, maior a capacidade de formação de gel.

A subfração ArK-d não geleificou mesmo na concentração de KCl 2 M. Como pode ser observado (TABELA 6.5), esta subfração apresenta relativamente baixa quantidade de 3,6-anidrogactose (17,6 mol %) quando comparada com as subfrações ArK-b e ArK-c, além de altos teores de sulfato (23,2 %), fatores que desfavorecem a precipitação quando em presença de íons potássio. Outra diferença marcante nessa subfração e que pôde contribuir enormemente para sua solubilização em KCl, é presença de agaranas, verificada pelo seu valor de rotação óptica negativo (- 12,0 °). As demais subfrações, exceto a subfração ArK-a, da qual não foi possível determinar a rotação óptica devido a sua turbidez quando em solução, apresentaram valores de rotação óptica positivos, sugerindo a presença predominante de carragenanas, uma vez que rotação positiva é indicativo de unidades pertencentes a série estereoquímica D. Desse modo, o fracionamento com KCl permitiu sugerir que *Agardhiella ramosissima* biossintetiza carragenanas (ArK-b e ArK-c) e agaranas (ArK-d), não podendo ser classificada como uma típica carragenófito (CHOPIN, 1999).

6.3.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho foram feitos nas diversas subfrações polissacarídicas obtidas da alga *A. ramosissima*, por precipitação com KCl, e estão apresentados nas FIGURAS 6.5 a 6.8, nas faixas de 1400 a 400 cm^{-1} .

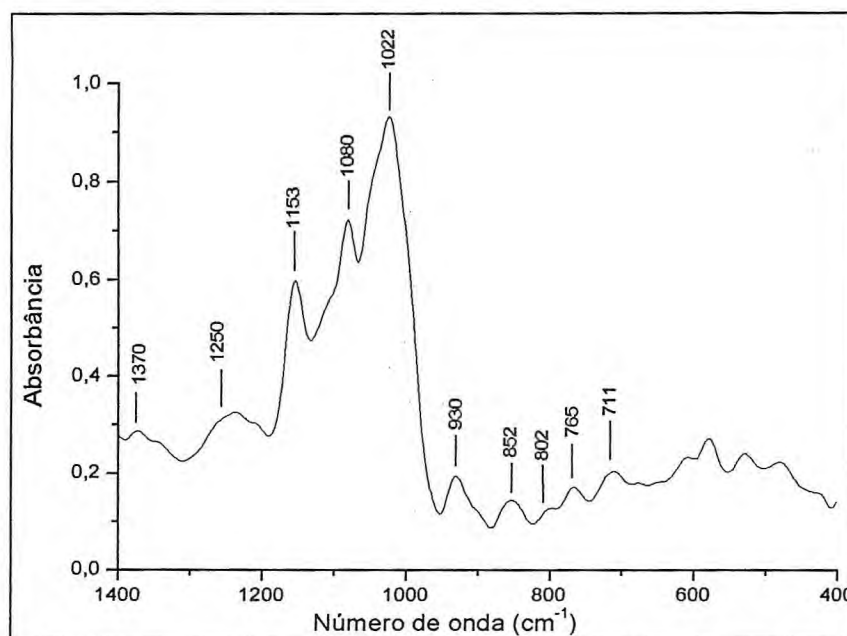


FIGURA 6.5. Espectro na região de infravermelho da subfração ArK-a em pastilha de KBr.

Como pode ser observado, a subfração ArK-a (FIGURA 6.5) demonstrou baixas intensidades de absorbâncias em 1250 e 1370 cm^{-1} , concordando com o baixo teor de sulfato apresentado na TABELA 6.5 para esta subfração. Como já seria previsto por ser uma molécula majoritariamente composta por glucose (TABELA 6.5), a subfração ArK-a não exibiu um padrão típico de galactana, pela atenuação na absorbância na região de 1080 cm^{-1} , a qual é proeminente para as outras subfrações (ArK-b, ArK-c e ArK-d), que são essencialmente galactanas (TABELA 6.5).

Absorbâncias menos intensas também foram observadas nas faixas de 930 a 805 cm^{-1} para a ArK-a, indicando pequenas quantidades de 3,6-anidrogactose (930 cm^{-1}), β -D-gactose-4-sulfato (852 cm^{-1}) e 3,6-anidrogactose-2-sulfato (802 cm^{-1}).

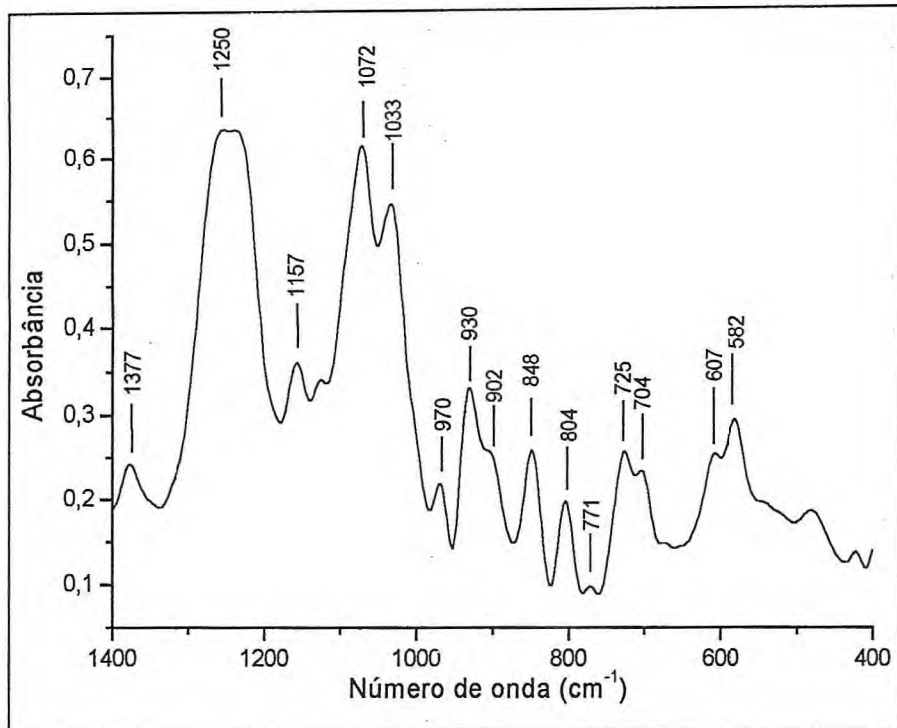


FIGURA 6.6. Espectro na região de infravermelho da subfração ArK-b em pastilha de KBr.

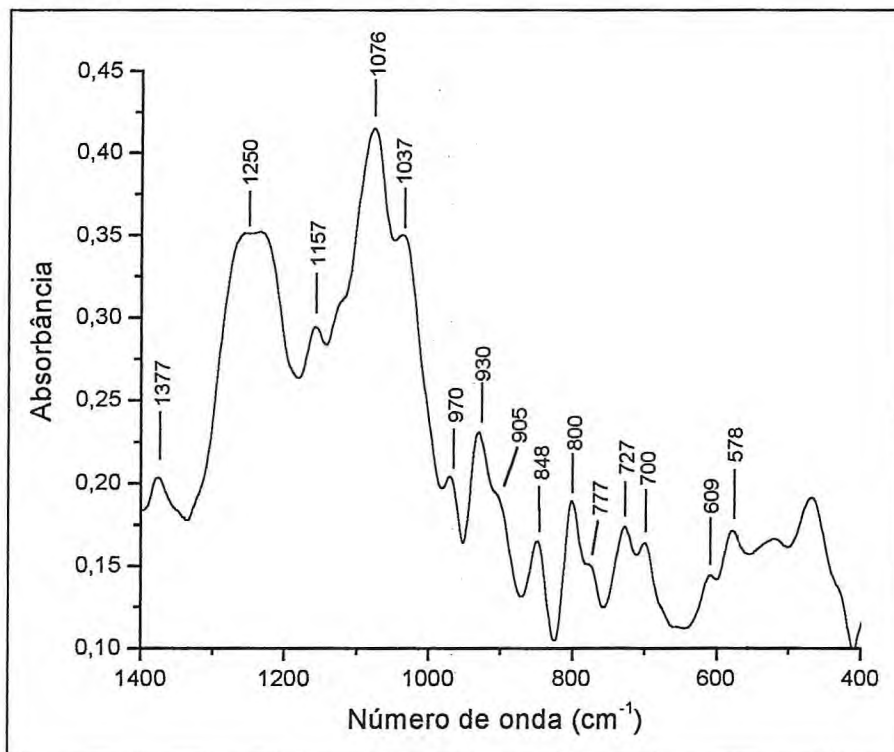


FIGURA 6.7. Espectro na região de infravermelho da subfração ArK-c em pastilha de KBr.

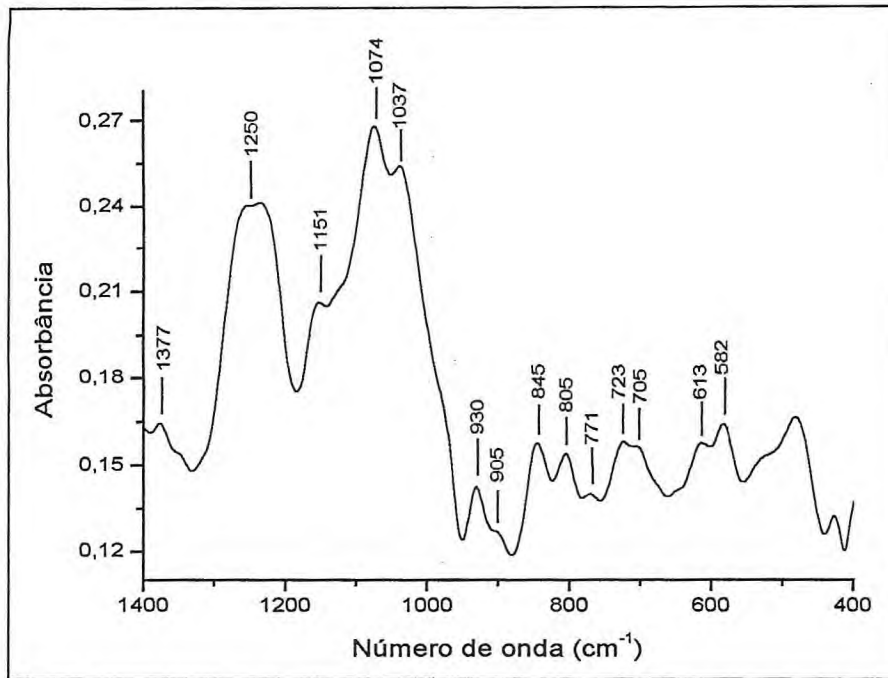


FIGURA 6.8. Espectro na região de infravermelho da subfração ArK-d em pastilha de KBr.

As demais subfrações obtidas pelo fracionamento com KCl, ArK-b, ArK-c e ArK-d (FIGURAS 6.6, 6.7 e 6.8, respectivamente), apresentaram perfis semelhantes, com pequenas diferenças quanto às intensidades de algumas bandas. Todas essas subfrações apresentaram absorvâncias bem elevadas na região de 1250 cm^{-1} , proporcionais aos seus respectivos teores de sulfato, mostrados na TABELA 6.5.

No espectro de infravermelho da fração ArS (FIGURA 6.1) pode-se observar apenas um ombro em 972 cm^{-1} , relativo à o-carragenana. Nas subfrações ArK-b e ArK-c, já percebe-se uma banda bem definida em 970 cm^{-1} e ausência da mesma em ArK-d.

As subfrações ArK-b, ArK-c e ArK-d apresentaram absorvâncias em 930, 845 e 805 cm^{-1} , referentes a unidades 3,6-anidrogactose, β -D-gactose-4-sulfato e 3,6-anidrogactose-2-sulfato, respectivamente, embora a subfração ArK-d tenha apresentado atenuações em todas essas absorvâncias. Diferente das outras duas, a subfração ArK-c apresentou absorvância em 805 cm^{-1} mais elevada que a absorvância em 845 cm^{-1} .

Dessa forma, exceto a subfração ArK-a, que é essencialmente uma glucana (TABELA 6.5), pelas análises de infravermelho das demais subfrações pode-se aferir que são compostas majoritariamente por iota-carragenana.

6.3.3. Espectro de RMN das subfrações ArK-b e ArK-c

Os espectros de RMN de ^{13}C das subfrações ArK-b e ArK-c (FIGURAS 6.9 e 6.10, respectivamente), foram muito semelhantes, com deslocamentos químicos na região anomérica em 102,8 e 92,7 ppm para a ArK-b e deslocamentos de 102,9 e 92,8 ppm para ArK-c, ambos correspondentes à unidade β -D-galactopiranosose-4-sulfato ligada à unidade 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato, sendo esta díade representativa da estrutura da iota-carragenana.

A TABELA 6.6. apresenta os deslocamentos químicos observados para as subfração ArK-b e ArK-c, tendo como base os assinalamentos referidos por Usov e Shashkov (1985).

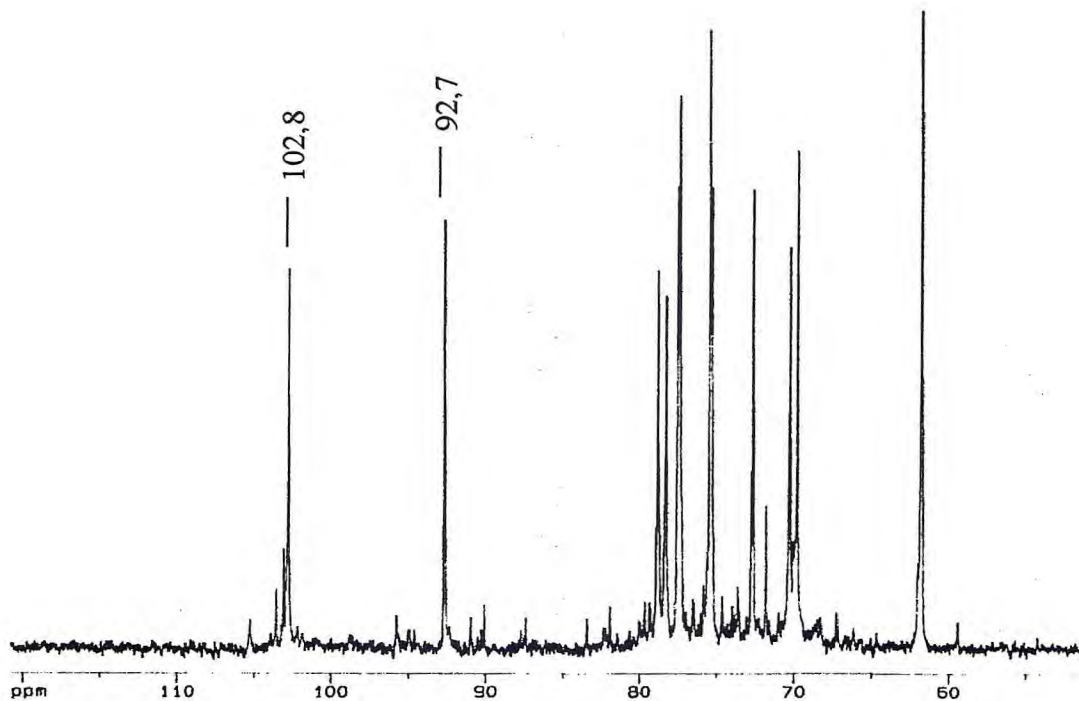


FIGURA 6.9. Espectro de RMN de ^{13}C da subfração ArK-b.

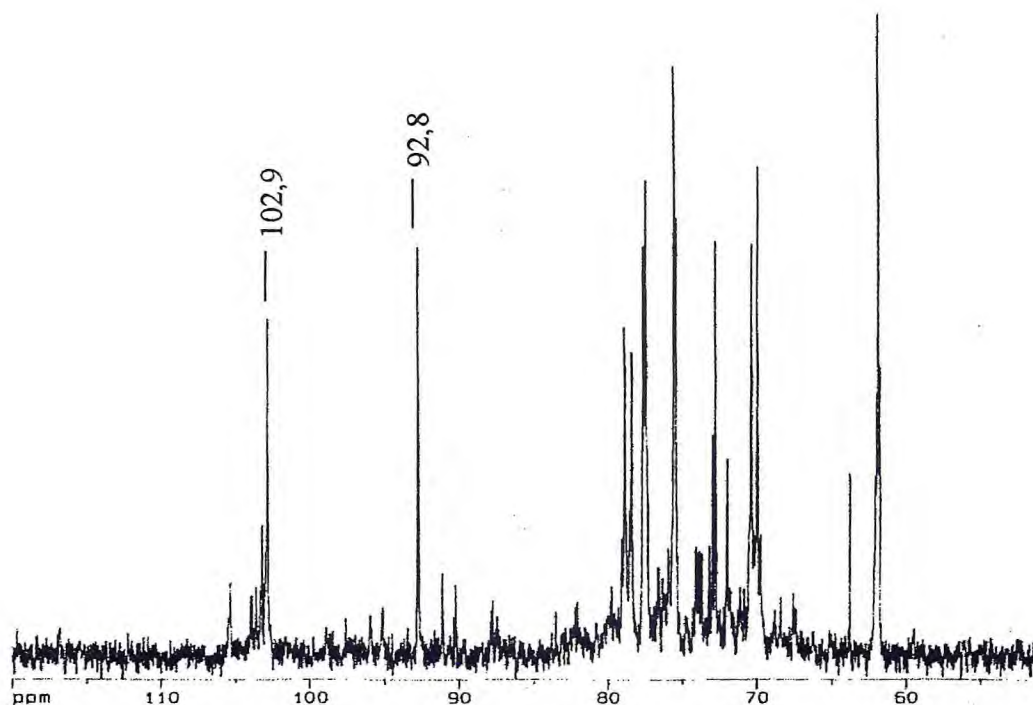


FIGURA 6.10. Espectro de RMN de ^{13}C da subfração ArK-c.

TABELA 6.6. Assinalamentos químicos de RMN de ^{13}C para ArK-b e ArK-c.

subfrações	Carragenana ^a		Unidade	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
ArK-b	G4S	Observado	A	102,8	69,9	77,4	72,8	75,4	61,9
	DA2S	Observado	B	92,7	75,5	78,4	78,9	77,6	70,3
ArK-c	G4S	Observado	A	102,9	70,0	77,5	72,8	75,5	62,0
	DA2S	Observado	B	92,8	75,6	78,5	79,0	77,7	70,4
	G4S	Referido ^b	A	102,2	69,3	76,8	72,2	74,8	61,3
	DA2S	Referido ^b	B	92,1	75,0	77,8	78,3	77,0	69,8

a = G4S: β -D-galactose-4-sulfato; DA2S: 3,6-anidro- α -D-galactose-2-sulfato.

b = USOV; SHASHKOV, 1985.

6.3.4. Determinação da massa molar

As galactanas Ark-b, Ark-c e Ark-d foram submetidas à cromatografia de permeação em gel (GPC) com a finalidade de determinar a distribuição de suas massas molares (FIGURAS 6.11 a 6.13, respectivamente). Pululanas com diversas massas molares foram empregadas como padrão de calibração da cromatografia.

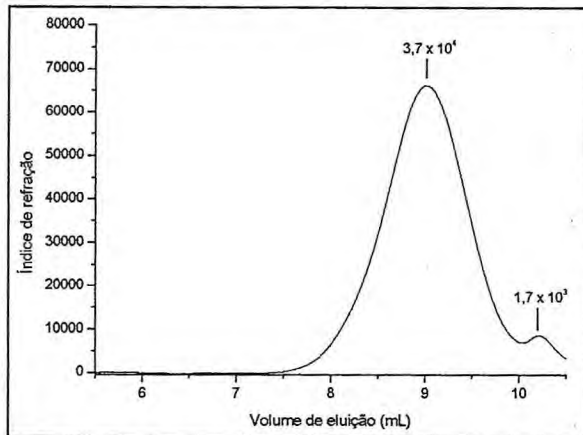


FIGURA 6.11. Cromatograma de GPC da subfração Ark-b.

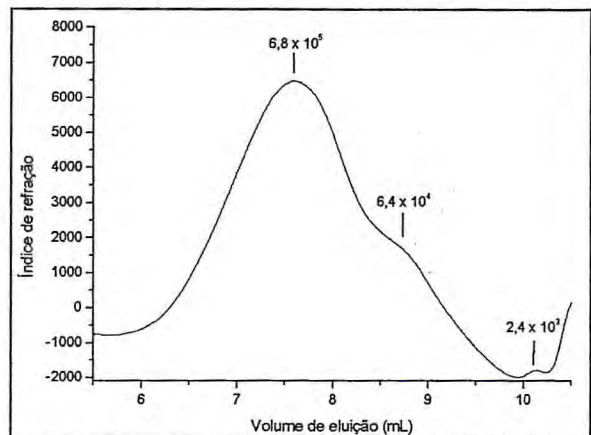


FIGURA 6.12. Cromatograma de GPC da subfração Ark-c.

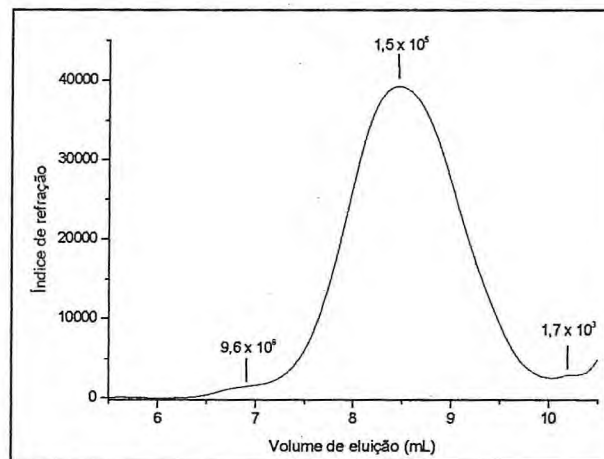


FIGURA 6.13. Cromatograma de GPC da subfração Ark-d.

Como pode ser observado pelos cromatogramas, todas as subfrações apresentaram alguns contaminantes de baixa massa molar (10^3). A subfração Ark-b apresentou pico principal no volume de eluição de 9,0 mL, com massa molar do pico (Mpk)

de 37.000 g/mol (Pico 1 – FIGURA 6.11). A subfração ArK-c apresentou maior distribuição de massa em um volume de 7,6 mL, com massa molar aproximada de 670.000 g/mol (Pico 1), e um ombro no volume de eluição de 8,6 mL, com massa molar aproximada de 64.000 g/mol (Pico 2 – FIGURA 6.12). A subfração ArK-d apresentou um ombro com volume de eluição de 6,8 mL, com massa molar de 9.500.000 g/mol (Pico 1), sua maior distribuição de massa molar foi no volume de 8,4 mL, com massa molar de 150.000 g/mol (TABELA 6.7).

TABELA 6.7. Massas molares para cada pico das subfrações de polissacarídeos obtidos por fracionamento com cloreto de potássio.

Subfrações	Picos	Volume de Eluição	Massa Molar
		(mL)	(g/mol)
ArK-b	1	9,0	$3,7 \times 10^4$
	2	10,2	$1,7 \times 10^3$
ArK-c	1	7,6	$6,8 \times 10^5$
	2	8,6	$6,4 \times 10^4$
	3	10,1	$2,4 \times 10^3$
ArK-d	1	6,8	$9,6 \times 10^6$
	2	8,4	$1,5 \times 10^5$
	3	10,2	$1,7 \times 10^3$

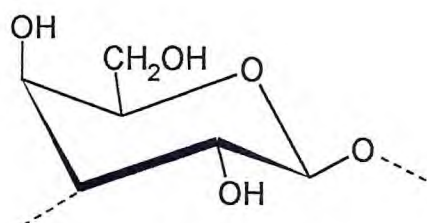
Estevez, Ciancia e Cerezo (2000), ao fracionarem os polissacarídeos extraídos à temperatura ambiente da alga *Kappaphycus alvarezzi*, com cloreto de potássio, obtiveram uma subfração solúvel na concentração de 2 M de KCl com massa molar de 12 kDa. A fração bruta depois de submetida ao tratamento alcalino e fracionamento com KCl, rendeu outras subfrações, e dentre elas, uma precipitada na concentração de 1,2-1,4 M de KCl com massa molar de 28,9 kDa, e outra subfração solúvel em 2 M de KCl com massa molar de 16,3 kDa. Os mesmos autores em 2004 fracionaram, com cloreto de potássio, os polissacarídeos da mesma alga extraídos a 90 °C, com a obtenção de subfrações precipitadas na concentração de 0,1-0,2 M de KCl com massa molar de 42 kDa, e subfração precipitada na faixa de 0,2-0,5 M de KCl, também com massa molar de 42 kDa. De acordo

com o presente trabalho, a subfração ArK-b precipitada com KCl na concentração de 1,0 M apresentou massa molar do principal pico de 37 kDa, um valor bem aproximado aos valores encontrados para as subfrações obtidas da alga *Kappaphycus alvarezzi* quando submetida à extração a 90 °C, mencionados acima. Entretanto, as subfrações ArK-c e ArK-d apresentaram massas molares principais de 680 e 150 kDa, muito superiores à massa molar encontrada para a subfração Ark-b.

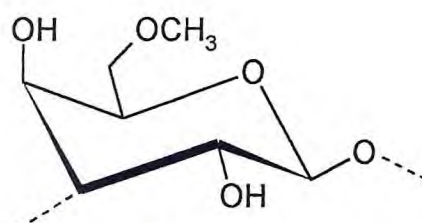
Os valores na TABELA 6.7 em **negrito** correspondem aos principais picos de cada fração.

Principais unidades monossacarídicas presentes na galactana ArS

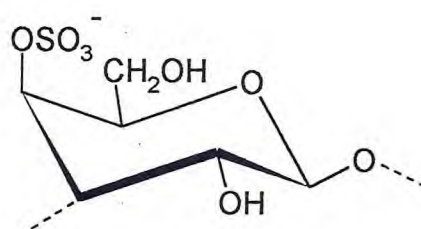
Unidades A



β -D-galactopiranosose

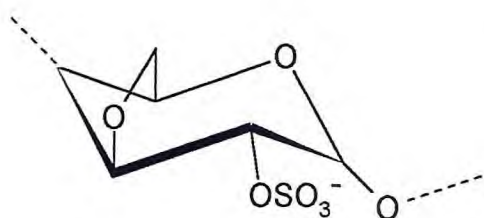


6-O-metil- β -D-galactopiranosose

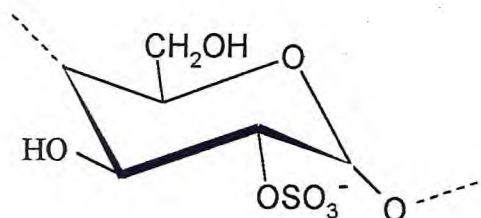


β -D-galactopiranosose-4-sulfato

Unidades B



3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato



α -D-galactopiranosose-2-sulfato

Parte 4

Aplicações Biológicas dos Polissacarídeos das Algas Marinhas

Gracilaria cornea e Agardhiella ramosissima

Sumário

7. Materiais e Métodos
8. Resultados e Discussão

7. Materiais e Métodos

7.1. ALGAS MARINHAS

Para os estudos de atividade biológica (atividade anticoagulante e efeito sobre a agregação plaquetária) foram utilizados os polissacarídeos obtidos das algas vermelhas *Gracilaria cornea* e *Agardhiella ramosissima*.

7.2. REAGENTES

A heparina padrão internacional (85/502), utilizada nos testes de atividade anticoagulante, foi obtida do National Institute for Biological Standards and Controls (Potters Bar, R.U.); Cefalina ativada da Celite-Biolab. Adenosina-difosfato (ADP) - (Helena Laboratories, U.S.A.). Os demais reagentes, obtidos comercialmente, foram de grau analítico.

7.3. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE *Gracilaria cornea* e *Agardhiella ramosissima*

7.3.1. "Pool" de plasma pobre em plaquetas

O plasma utilizado nos testes de APTT e TT foi preparado em seringas contendo 0,5 mL de citrato de sódio 3,8 %, pela coleta de amostras de sangue (4,5 mL) de pelo menos 4 doadores, a fim de garantir que o mesmo não fosse carente de nenhuma enzima ou cofator plasmático. O plasma foi separado do sangue por centrifugação a 3,000 rpm por 10 minutos em uma centrífuga clínica (modelo LS-II), em seguida agrupado e estocado a -70°C .

7.3.2. Atividade anticoagulante pelo teste do Tempo de Ativação Parcial da Tromboplastina (APTT)

Os ensaios de atividade anticoagulante pelo teste do APTT foram realizados com as diversas frações obtidas das algas *G. cornea* e *A. ramosissima* de acordo com a metodologia descrita por Anderson et al. (1976). O plasma (90 μL) foi incubado a 37 °C durante um minuto com 10 μL de uma solução de polissacarídeo (0,05 – 5 μg). Em seguida, 100 μL de cefalina ativada (Celite – Biolab) foram adicionados à mistura e incubados na mesma temperatura por mais 2 min a 37 °C. Após o período de incubação, a reação foi iniciada através da adição de 100 μL de uma solução de cloreto de cálcio 0,025 M e o tempo de coagulação foi determinado em um coagulômetro (Amelung KC4A). A atividade anticoagulante foi expressa em segundos utilizando-se uma curva paralela obtida com um padrão de heparina (193 unidades internacionais/mg).

7.3.3. Atividade anticoagulante pelo teste do Tempo de Trombina (TT)

O teste de TT foi realizado de acordo com o método de Denson e Bonnar, citado por Nishino, Aizu e Nagumo (1991), com algumas modificações. O plasma (90 μL) foi incubado a 37 °C durante 2 min com 10 μL de uma solução de polissacarídeos sulfatados (fração ArS). Em seguida, 100 μL de trombina humana (20 nM) foram adicionados à mistura de incubação e o tempo de coagulação foi registrado em um coagulômetro (Amelung KC4a).

7.4. ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *Gracilaria cornea* e *Agardhiella ramosissima* SOBRE A AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS *IN VITRO*

7.4.1. Colheita do sangue e obtenção do plasma

O sangue para realização deste teste foi obtido por colheita em indivíduos aparentemente saudáveis, não fumantes e que não estivessem fazendo uso de medicamentos. O sangue colhido foi centrifugado a 1000 x g por duas vezes durante 6 minutos, à temperatura ambiente, para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o restante da amostra de sangue foi novamente centrifugado, a 3000 x g por 15 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Os experimentos foram realizados em um período de até três horas após a colheita do sangue para evitar uma possível interferência nos ensaios devido a modificações na estrutura das plaquetas.

7.4.2. Testes de agregação plaquetária

Os testes de agregação plaquetária, realizados segundo o método descrito por Born e Cross (1963) utilizando agregômetro e registrador acoplados, baseia-se na avaliação do efeito inibitório de uma determinada droga sobre a ativação de plaquetas, a partir da adição de um agente agregante (agonista) em plasma rico em plaquetas. Em duas cubetas de vidro foram colocados 450µL de PRP e PPP, respectivamente, para determinação dos picos máximo e mínimo no registrador. A agregação foi induzida pela adição de um agente agregante (ADP) ao PRP, o qual foi mantido à temperatura constante de 37 °C, sob agitação contínua a 1200 rpm. A turvação do PRP diminui quando ocorre a agregação. A transmitância foi medida em espectrofotômetro e os dados plotados em curva.

A inibição da agregação plaquetária foi expressa comparando-se a altura da curva de agregação na presença do inibidor com aquela apresentada pelo controle (na ausência do agonista).

7.4.3. Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP pelos polissacarídeos sulfatados solúveis obtidos de *Agardhiella ramosissima* (fração ArS) e *Gracilaria cornea* (Gc2S)

A atividade antiagregante da fração ArS obtida de *A. ramosissima* e da fração Gc2S obtida de *G. cornea* foi determinada frente ao agonista ADP.

Para cada “pool” de PRP empregado, os polissacarídeos foram testados nas doses de 50, 100, 200 e 400 µg/mL frente o ADP, para a fração ArS e nas doses de 100 e 200 µg/mL para a fração Gc2S.

A concentração do agonista empregada nos ensaios foi de 10^{-5} M.

A avaliação estatística foi feita submetendo-se os dados à análise de variância, expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.), utilizando-se o programa Graph Pad InStat/ versão 2.05 – Copyright (1990-1994).

8. Resultados e Discussão

8.1. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

A análise da atividade anticoagulante pelo teste do Tempo de Ativação da Tromboplastina (APTT) mostrou um prolongamento do tempo de coagulação sanguínea pelas diversas frações de *Agardhiella ramosissima* (FIGURA 8.1), um fraco efeito da subfração ArK-b e nenhum efeito sobre o tempo de coagulação pela fração solúvel de *A. ramosissima* submetida a dessulfatação (ArS-D - TABELA 8.1) e pelas frações de *Gracilaria cornea* (TABELA 8.2).

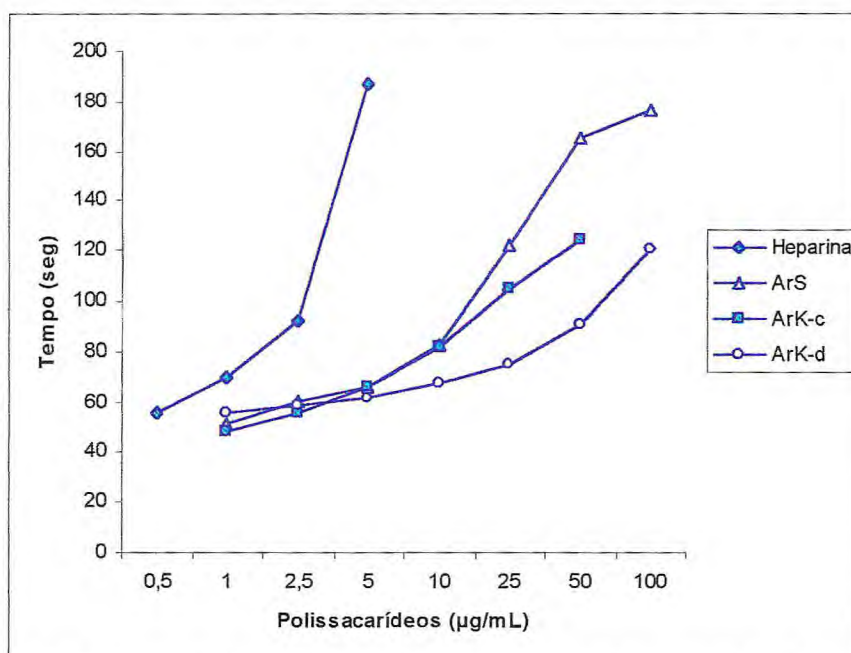


FIGURA 8.1. Teste de APTT dos polissacarídeos da alga *Agardhiella ramosissima*, utilizando como padrão a Heparina. ArS é a fração solúvel em meio aquoso a 0,2%, obtidas a partir de ArB. ArK-c é a subfração precipitada com KCl 1,5 M, obtida a partir de ArS. ArK-d é a subfração solúvel em KCl 2,0 M, obtida a partir de ArS.

Como pode ser observado na FIGURA 8.1, as frações ArS, ArK-c e ArK-d apresentaram curvas de atividade anticoagulante similares, com valores mais baixos em relação à curva da heparina. Todas as frações ativas possuem teores de sulfato variando de 23,2 a 27,2 % e massas molares de 1,5 a $7,4 \times 10^5$ g/mol, equivalente a 150 e 740 kDa. Dessa forma, a fração menos ativa (ArK-d) é detentora da menor porcentagem de sulfato e menor massa molar, quando é levado em consideração as três frações ativas de *A. ramosissima*.

No entanto, a subfração ArK-b dotada de maior teor de sulfato (32,5 %) dentre as frações de *A. ramosissima*, não apresentou atividade anticoagulante (TABELA 8.1).

TABELA 8.1. Atividade anticoagulante pelo teste de APTT das frações de *A. ramosissima*.

Doses ($\mu\text{g/mL}$)	APTT (s) ^a				
	Frações				
	ArS	ArK-b	ArK-c	ArK-d	ArS-D
500	>180	73,4	>180	>180	37,5
250	>180	54,3	>180	>180	
100	176,2	48,8	>180	120,2	
50	165,2		124,2	90,1	
25	121,5		104,3	74,5	
10	81,9		81,3	67,5	
5	65,3		66,0	61,2	
2,5	59,6		55,2	58,1	
1	50,4		47,4	55,4	
0,5	41,8				

a = controle do tempo de coagulação sem inibidor foi de 38,5s.

Segundo Melo et al. (2004), galactanas sulfatadas requerem cadeias significativamente maiores do que a da heparina para apresentar atividade anticoagulante. Possivelmente, é o conjunto estrutural das galactanas sulfatadas e não somente componentes específicos menores, como ocorre com a heparina, que determina sua interação com a antitrombina. Galactanas sulfatadas contendo entre 15 e 45 kDa se ligam

à antitrombina mas são incapazes de ligar este inibidor plasmático à trombina. Este último efeito requer uma massa molecular superior a 45 kDa. Os requerimentos estruturais para a interação de galactanas sulfatadas aos inibidores da coagulação e suas proteases alvo não são meramente uma consequência da sua densidade de carga.

Diante dessas informações, é provável que a baixa massa molar (37 kDa) apresentada pela subfração ArK-b tenha sido o fator estrutural limitante, tornando a subfração incapaz de ligar a antitrombina à trombina.

Entretanto, a fração ArS submetida à dessulfatação (ArS-D), com perda de aproximadamente 50 % do teor de sulfato, principalmente sulfato em C-2 da unidade B, perdeu também a capacidade de prolongar o tempo de coagulação, o que sugere a importância dos grupos sulfatos para esta atividade (TABELA 8.1).

De outra forma, embora as frações de *G. cornea* submetidas ao teste de APTT possuam elevadas massas molares (variando de 220 a 420 kDa), seu conteúdo de sulfato se encontra abaixo de 20 %, o que seria, segundo Haroun-Bouhedja et al. (2000), um valor mínimo para se obter um pequeno efeito anticoagulante. Corroborando com esses dados, Mazumder et al. (2002) afirmaram que devido ao conteúdo de sulfato de espécies do gênero *Gracilaria*, geralmente seus polissacarídeos não apresentam atividade anticoagulante. Os dados das frações de *G. cornea* estão apresentados na TABELA 8.1.

TABELA 8.2. Atividade anticoagulante pelo teste de APTT das frações de *G. cornea*.

Doses ($\mu\text{g/mL}$)	APTT (s) ^a			
	Frações			
	Gc2S	Gc2S-a	Gc2S-b	Gc2S-c
500	42,5	40,0	39,1	53,8

a = controle do tempo de coagulação sem inibidor foi de 39,5s.

As agaranas obtidas da alga *Acanthophora spicifera*, com teores de sulfato variando de 4,7 a 26,4 % para as frações avaliadas quanto à atividade anticoagulante pelo teste de APTT, demonstraram fraca ou ausência dessa atividade, pois em altas concentrações como de 500 $\mu\text{g/mL}$ a fração mais ativa foi capaz apenas de triplicar o tempo de coagulação sanguínea (DUARTE et al., 2004).

Por apresentar maior atividade frente ao teste de APTT, a fração ArS foi ainda testada quanto a sua ação sobre o tempo de trombina (TT). A FIGURA 8.2 mostra que aos acréscimos nas concentrações da fração ArS, são observadas diminuições da atividade da trombina, ao passo que, numa concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, a fração ArS foi capaz de inibir 85 % da atividade da trombina.

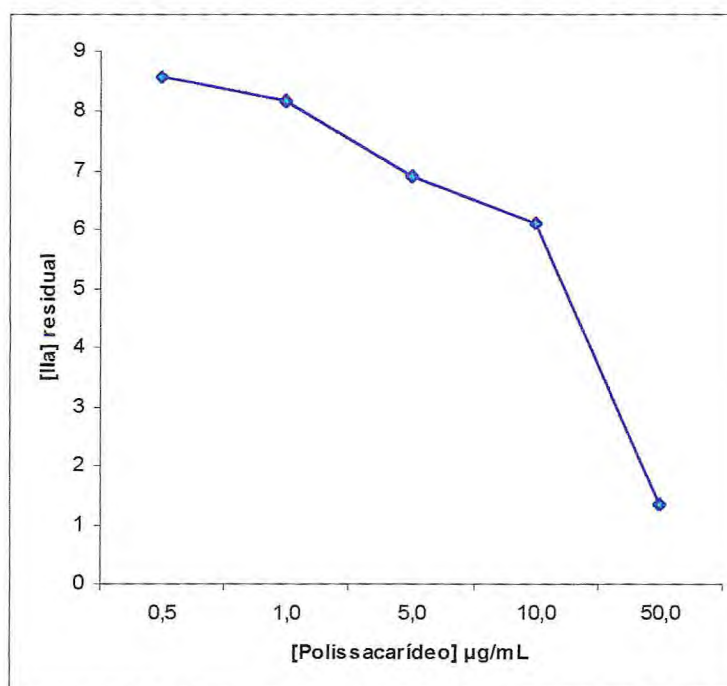


FIGURA 8.2. Teste de TT dos polissacarídeos da alga *Agardhiella ramosissima*, utilizando como padrão a Trombina. (■—■) ArS é a fração solúvel em meio aquoso, a 0,2%, obtidas a partir de ArB.

Portanto, os polissacarídeos sulfatados obtidos da alga *Agardhiella ramosissima*, em especial as frações de maiores massas molares, apresentaram capacidade de prolongamento do tempo de coagulação pelo teste de APTT, com baixas atividades anticoagulantes quando comparados com a heparina.

Galactanas sulfatadas e a heparina se ligam a diferentes sítios na antitrombina. Galactanas sulfatadas são menos efetivas do que a heparina em promover a ativação conformacional da antitrombina. Essas observações indicam que um mecanismo diferente

predomina na ativação conformacional da antitrombina que resulta da atividade anticoagulante, mediada pelas galactanas sulfatadas. Possivelmente, as galactanas sulfatadas conectam antitrombina e trombina, unindo estas proteases em uma forma inativa. A ativação conformacional da antitrombina com a conseqüente formação do complexo com a trombina parece ser menos importante do que para a heparina. Dessa maneira, cada tipo de polissacarídeo pode formar um complexo particular com um inibidor plasmático e uma protease (MELO et al., 2004).

8.2. INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP EM PRP

Em relação à atividade antiagregante, a grande maioria dos trabalhos refere-se a componentes e substâncias extraídas de plantas superiores ou do veneno de serpentes. A maior fonte de substâncias que são capazes de inibir a agregação de plaquetas encontra-se no reino vegetal, onde diversas frações de extratos de plantas têm sido empregadas nos estudos da ativação e inibição plaquetária. A partir de plantas com efeitos medicinais e de uso terapêutico conhecido, até mesmo comprovado cientificamente, novas drogas antiagregantes surgiram (LEE; KIN, 2005; MEKHFI et al., 2004; SARRAY et al., 2003.).

Contudo, são escassos na literatura relatos quanto à atividade de componentes algais frente à ativação plaquetária. Com relação ao elevado número de trabalhos referentes à ação anticoagulante e antitrombótica de polissacarídeos de algas marinhas, sabe-se que embora as plaquetas estejam intimamente relacionadas com os mecanismos de formação do trombo, a maioria desses compostos dotados com tais atividades atua direta ou indiretamente nos fatores da cascata de coagulação e não de forma direta sobre as plaquetas ou agentes agregantes (SILVA, 2004).

Nesse estudo, as frações solúveis de *Agardhiella ramosissima* (ArS) e de *Gracilaria cornea* (Gc2S) foram empregadas em testes de ativação plaquetária para analisar seus efeitos na interação de plaquetas humanas.

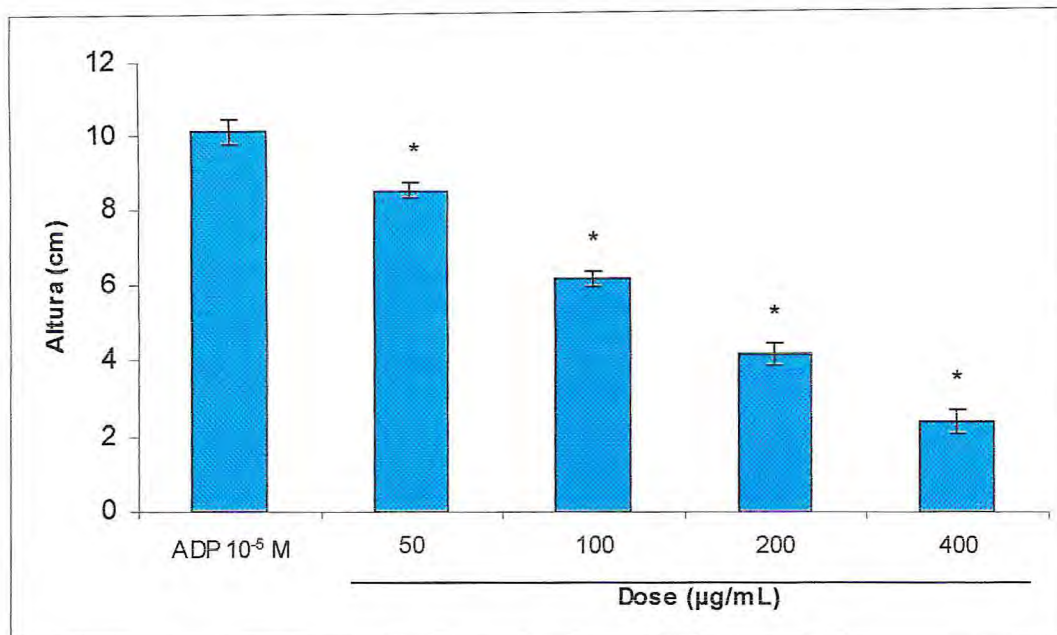
Para o estudo com as frações de ArS, quatro doses foram empregadas em plasmas onde foram adicionados ADP (TABELA 8.3). Avaliando os efeitos em relação ao agonista empregado (ADP), a fração ArS inibiu a agregação plaquetária em todas as doses testadas.

A FIGURA 8.3 mostra o perfil de ação da fração ArS frente ao agonista ADP. Nas doses de 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, houve redução da altura das curvas de agregação, após acréscimo do agente agregante em 15,8, 39,0, 58,4 e 76,2 %, respectivamente (TABELA 8.3). A partir da análise desses resultados, pode ser observado que a relação dose-efeito estabelece um sistema dose dependente (FIGURA 8.4).

TABELA 8.3. Ação inibitória do polissacarídeo sulfatado solúvel obtido de *A. ramosissima* (ArS) na agregação plaquetária induzida por ADP.

Ensaio	Altura da Curva de Agregação (cm)				
	ADP	Doses de ArS ($\mu\text{g/mL}$)			
	(10^{-5}M)	50	100	200	400
1	10,9	8,9	5,0	3,2	2,3
2	10,8	8,9	6,3	3,7	2,3
3	10,2	8,4	6,6	4,2	2,4
4	10,0	8,6	7,1	5,7	3,8
5	10,8	8,4	6,5	4,4	3,2
6	11,1	7,4	6,1	4,0	
7	9,3		5,7	4,2	
8	9,2		6,0		
9	8,9				
10	7,6				
MÉDIA	10,1	8,5	6,16	4,2	2,4
\pm EPM	$\pm 0,35$	$\pm 0,23$	$\pm 0,22$	± 29	$\pm 0,30$
% de Inibição	-	15,8 *	39,0 *	58,4 *	76,2 *

* $P < 0,01$, Student-Newman-Keuls Method (comparado ao controle).



* P < 0,01, Student-Newman-Keuls Method (comparado ao controle).

FIGURA 8.3. Ação inibitória da fração ArS na agregação de plaquetas induzidas por ADP.

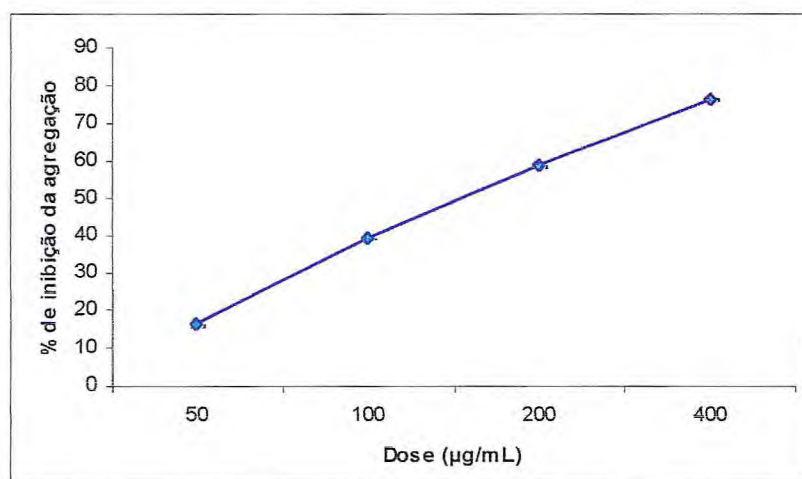


FIGURA 8.4. Curva de relação dose-efeito da fração ArS em plaquetas ativadas por ADP.

Em relação aos polissacarídeos sulfatados solúveis de *G. cornea* (fração Gc2S), apenas duas doses foram empregadas, enquanto teste inicial, usando ADP como agonista (TABELA 8.4). Como pode ser observado, as doses de 100 e 200 µg/mL testadas não foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP.

TABELA 8.4. Ação inibitória do polissacarídeo sulfatado solúvel obtido de *G. cornea* (Gc2S) na agregação plaquetária induzida por ADP.

Ensaio	Altura da Curva de Agregação (cm)		
	ADP (10^{-5} M)	Doses de Gc2S (µg/mL)	
		100	200
1	10,0	10,8	10,2
2	10,8	10,4	9,6
3	10,9	10,4	10,1
4	10,8		
5	10,2		

O ADP, assim como outros agentes agregantes, modifica a superfície da membrana plasmática da plaqueta de modo tal que o fibrinogênio se liga ao complexo glicoprotéico, GPIIb/IIIa, na superfície da plaqueta ativada (RAND; HARTFENIST; MURRAY, 1998). Além disso, resulta em agregação propriamente dita, produção de tromboxano A₂ e secreção de grânulos, o que desencadeia a ativação de outras plaquetas adjacentes. O ADP também é responsável pela mobilização de cálcio estocado no citoplasma promovendo seu rápido influxo. Apesar dos avanços nos estudos dos mecanismos envolvendo o ADP na ativação plaquetária, ainda não se chegou à respostas definitivas quanto à elucidação dos mecanismos de transdução de sinais desencadeados pelo receptor (JIN et al., 1998 apud FERREIRA, 2001).

O polissacarídeo sulfatado obtido da alga vermelha *Bryothamnion seaforthii* foi empregado em testes de ativação plaquetária frente a três agonistas muito utilizados (ADP, ácido aracdônio e colágeno) e foi capaz de interferir no processo de ativação plaquetária frente aos três agonistas testados. Contudo, tomando como exemplo a ação dos polissacarídeos frente ao ADP, foi verificado que seria necessário uma dose de 4,4 mg/mL para causar inibição da agregação plaquetária de 73,2 %. De maneira geral, as altas

concentrações utilizadas, capazes de efetivar inibições significativas, poderiam tornar os polissacarídeos de *B. seaforthii* não adequados à utilização terapêutica (SILVA, 2004).

Comparando esses resultados com os obtidos nesse trabalho, para causar uma inibição de 76,2 % da agregação plaquetária frente ao ADP, seria necessário 0,4 mg/mL da fração ArS em estudo, uma quantidade 11 vezes menor que a necessária para o polissacarídeo de *B. seaforthii*.

Güven, Özsoy e Ulutin (1991) investigaram o efeito de algumas carragenanas e ácido algínico obtidos comercialmente, sobre a agregação plaquetária frente ao ADP. A atividade antiplaquetária de carragenanas mostrou que a agregação induzida por ADP foi ligeiramente inibida por uma iota-carragenana (65,4 % de inibição), enquanto que lambda e kappa-carragenanas não foram tão efetivas (12,1 e 29,0 % de inibição, respectivamente). Por sua vez, o ácido algínico não mostrou nenhum efeito sobre o sistema de agregação plaquetária. Ainda que os autores não tenham feito discussões a fim de correlacionar estrutura *versus* atividade biológica, os sistemas de carragenanas testados podem levar a crer que o grupamento sulfato no carbono 4 da unidade A, parece ser importante para a referida atividade, uma vez que a lambda-carragenana, sulfatada na unidade A em C-2, apresentou menor efeito antiplaquetário. Há de ser levado em consideração também a sulfatação em C-2 da unidade B, visto que sua ausência em kappa-carragenana pode ter limitado a eficácia dessa molécula na inibição da agregação plaquetária. Todavia, como vem sendo demonstrado nos estudos de atividade biológica, além do número e distribuição das cargas, a massa molar do polímero é um outro fator que também deve ser levado em consideração.

Deste modo, há a necessidade de mais estudos envolvendo a relação entre estrutura de polissacarídeos sulfatados de algas e seus efeitos sobre a agregação plaquetária, para que possam favorecer um melhor entendimento da influência de suas cargas negativas, bem como dos mecanismos de ação dessas moléculas sobre o sistema plaquetário.

Subparte

Sumário

9. Conclusões

10. Referências Bibliográficas

9. Conclusões

A análise estrutural por métodos químicos e espectroscópicos demonstrou que a alga vermelha *Gracilaria cornea* (Gracilariales) biossintetiza galactanas do tipo agarana, constituída principalmente por unidades de β -D-galactose e 3,6-anidro- α -L-galactose. Esta apresenta baixo grau de substituição em C-6 das unidades A e B, por grupos *O*-metil e sulfato, respectivamente. A agarana de *G. cornea* apresenta ainda baixa xiloglicosilação em C-6 e/ou C-4 da unidade A e/ou em C-3 da unidade α -L-galactose (unidade B não ciclizada). Suas frações mais homogêneas, Gc2S-b e Gc2S-c, possuem massas molares de $3,5 \times 10^5$ e $3,8 \times 10^5$ g/mol, respectivamente. Por seus baixos teores de sulfato, não apresentaram atividade anticoagulante, e não foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP.

A análise estrutural por métodos químicos e espectroscópicos demonstrou que a alga vermelha *Agardhiella ramosissima* (Gigartinales) biossintetiza galactanas do tipo carragenana, altamente sulfatadas e compostas principalmente por unidades de β -D-galactose-4-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactose-2-sulfato, sendo esta díade representativa da estrutura da iota-carragenana. Suas frações mais homogêneas, ArK-b e ArK-d, possuem massas molares de $3,7 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^5$ g/mol, respectivamente. A fração solúvel apresentou atividade anticoagulante e foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP.

10. Referências Bibliográficas

AMIMI, A.; MOURADI, A.; GIVERNAUD, T.; CHIADMI, N.; LAHAYE, M. Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 333, p. 271-279, 2001.

ANDERSON, L. O.; BARROWCLIFFE, T. W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E. A.; SIMS, G. F. C. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. **Thromb. Res.**, v. 9, p. 575-580, 1976.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **J. Applied Phycol.**, v. 7, p. 231-243, 1995.

BICK, R. L.; MURANO, G. – Physiology of hemostasis. **Clin. Lab. Med.**, v. 14, p. 677-707, 1994.

BILAN, M. I.; GRACHEV, A. A.; USTUZHANINA, N. E.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 511-517, 2004.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A. M.; DE AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ, J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs Fut.**, v. 20, p. 1237-1249, 1995.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **J. Physiol.**, v. 168, p. 178-195, 1963.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives:

correlation between structure and biological activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 20, p. 97-105, 1997.

CASSOLATO, J. E. F., Determinação da estrutura química de xilogalactanas sulfatadas e xilanas neutras isoladas das algas vermelhas *Amansia multifida* e *Osmundaria obtusiloba* (Ceramiales, Rhodomelaceae). **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, 2004.

CAUDURO, J. P.; NOSEDA, M. D.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure of the sulfated polysaccharides extracted from red seaweed *Acanthophora spicifera*. In: PROCEEDINGS OF THE THIRD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES (ISNaPol 2000), São Pedro-SP, 2000.

CEDRO, A; PORTA, R; CATTANEO, F; TRENTO, F; FERRO, L; LANZAROTTI, L. Fucans with low molecular weight having anticoagulant, antihrombinic and antithrombotic activity. United States Patent n° 5.948.405, September 1999.

CEREZO, A. S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of κ -carrageenan. **J. Chem. Soc.**, (C), p. 992-997, 1967.

CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M.; BOISSON-VIDAL, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. **Carbohydr. Res.**, v. 319, p. 154-165, 1999.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D. J.; MUNRO, S. L. A.; KRAFT, G. T.; LIAO, M. L. Carrageenans with complex substitution patterns from red algae of the genus *Erythroclonium*. **Carbohydr. Res.**, v. 305, p. 243-252, 1998.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D. J.; MUNRO, S. L. A.; KRAFT, G. T.; LIAO, M. L. Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae

(Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. **Carbohydr. Res.**, v. 299, p. 229-243, 1997.

CHIZHOV, A. O.; DELL, A.; MORRIS, H. R.; HASLAM, S. M.; McDOWELL, R. A.; SHASHKOV, A. S.; NIFANT'EV, N. E.; KHATUNTSEVA, E. A. USOV, A. I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. **Carbohydr. Res.**, v. 320, p. 108-119, 1999.

CHOPIN, T.; KERIN, B. F.; MAZEROLLE, R. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae. **Phycol. Res.**, v. 47, p. 167-188, 1999.

CHOPIN, T.; WHALEN, E. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydr. Res.**, v. 246, p. 51-59, 1993.

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. A L-galactose-containing carrageenan from cystocarpic *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1009-1013, 1997.

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.**, v. 20, p. 95-98, 1993.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COOMBE, D. R.; PARISH, C. R.; RAMSHAW, I. E.; SNOWDEN, J. M. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulphated polysaccharides. **Int. J. Cancer.**, v. 39, p. 82-88, 1987.

COTE, G.L.; HANISAK, M.D. Production and properties of native agars from *Gracilaria tikvahiae* and other red algae. **Bot. Mar.**, v. 29, p. 359-366, 1986.

CRAIGIE, J. S. **Cell walls**. In: COLE, K. M.; SHEATH, R. G. (eds), *Biology of the Red Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990, p. 221-257.

CRAIGIE, J. S.; WEN, Z. C.; VAN DER MEER, J. P. Interspecific, Intraspecific and Nutritionally-Determined Variations in the Composition of Agars from *Gracilaria* spp.. **Bot. Mar.**, v. 27, p. 55-61, 1984.

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

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

DUARTE, M. E. R.; CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Structural studies on fucoidans from the Brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydr. Res.**, v. 333, p. 281-293, 2001a.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, p. 53-58, 2001b.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A.; TULIO, S.; CEREZO, A. S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 1137-1144, 2002.

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

ELIAS, D. O.; SOUZA, M. H. **Trombocitopenia induzida pela heparina**. Disponível em: <<http://www.hemonline.com.br/heparina.htm>> Acesso em: 18 abril 2005.

ELLOUALI, M.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. Antitumor activity of low molecular weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Anticancer Res.**, v. 13, p. 2011-2020, 1993.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. DL-galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. **Carbohydr. Res.**, v. 331, p. 27-41, 2001.

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

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroides from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. **Carbohydr. Res.**, v. 325, p. 287-299, 2000.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H.; WONG, H.; LIAO, M. L. BACIC, A.; CHANDRKRACHANG, S. Structural analysis of carrageenans from Burnese and Thai samples of *Catenella nipae* Zanardini. **Carbohydr. Res.**, v. 285, p. 81-98, 1996.

FARIA, P. C. S. Estrutura química de carragenanas e galactanas híbridas D/L isoladas de *Gymnogongrus griffithsiae* (Gigartilanes, Rhodophyta). **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, 2002.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 29299–29307, 2000.

FERNÁNDEZ, L. E.; VALIENTE, O. G.; MAINARDI, V.; BELLO, J. L. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria dominguensis*. **Carbohydr. Res.**, v. 190, p. 77-83, 1989.

FERREIRA, M. A. D. Estudo de efeitos tóxicos e atividades farmacológicas da fração quinona de *Auxemma oncocalyx* Taub. **Tese de doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, Fortaleza, 2001.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; MURANO, E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. **Biores. Technol.**, v. 96, p. 295-302, 2005.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Effects of season on the Agar content and chemical characteristics of *Gracilaria cornea* from Yucatán, México. **Bot. Mar.**, v. 40, p. 285-290, 1997.

FURNEAUX, R. H.; MILLER, I. J. Water soluble polysaccharides from the New Zealand red algae in the family Phylloporaceae. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 28, p. 419-425, 1985.

FURNEAUX, R. H.; STEVENSON, T. T. The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 615-620, 1990.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3151-3157, 2004.

GEOCITIES. Anticoagulantes, inibidores plaquetários e trombóticos. Disponível em: <www.geocities.com/Athens/Sparta/9758/hemato/hemato.htm> Acesso em: 02 fev. 2005.

GOMES, M. E. W.; FABRIS, C.; FILHO, J. L. B.; DREHER, R.; ROSITO, G. A. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. Revista da Associação Médica Brasileira. Disponível em: [http:// www.scielo.br/scielo.phpscript](http://www.scielo.br/scielo.phpscript). Acesso em: 18.10.2004.

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

GÜVEN, K. C.; ÖZSOY, Y.; ULUTIN, O. N. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. **Bot. Mar.**, v. 34, p. 429-432, 1991.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; ELLOUALI, M.; SINQUIN, C.; BOISSON-VIDAL, C. Relationship between sulfate group and biological activities of fucans. **Thromb. Res.**, v. 100, p. 453-459, 2000.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J. B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1543, p. 86-94, 2000.

HIROISHI, S.; SUGIE, K.; YOSHIDA, T.; MORIMOTO, J.; TANIGUCHI, Y.; IMAI, S.; KUREBAYASHI, J. Antitumor effects of *Marginisporum crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga. **Canc. Lett.**, v. 167, p. 145-150, 2001.

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

JESKE, W. P.; BAKHOS, M.; HAAS, S.; HERBERT, J. M.; ERO, M.; SZATKOWSKI, E.; WALENGA, J. M. Effect of glycoprotein IIb/IIIa antagonists on the HIT serum induced activation of platelets. **Thromb. Res.**, v. 3, p. 271-281, 1997.

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

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.**, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKY, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Bot. Mar.**, v. 37, p. 163-169, 1994.

KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C. Desulfation of sulfated galactanas with chlorotrimethylsilane. Characterization of β -carrageenan by ^1H NMR spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 1619-1629, 2004.

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65, p. 173-179, 2003.

LAHAYE, M. Development on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **J. Applied Phycol.**, v. 13, p. 173-184, 2001.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 283, p. 161-173, 1996.

LAHAYE, M.; YAPHE, W. The chemical structure of agar from *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville, *G. cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. damaecornis* J. Agardh and *G. domingensis* Sonder ex Kützing (Gigartinales, Rhodophyta). **Bot. Mar.**, v. 32, p. 369-377, 1989.

LEE, K. A.; KIN, S. H. SSGE and DEE, new peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation. **Food Chemistry**, v. 90, p. 389-393, 2005.

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAJCZAK, G. A. H.; RICHARTZ, R. R. T. B.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Antiherpetic activity of heterofucans isolated from *Sargassum stenophyllum* (Fuciales, Phaeophyta). In: CHAPMAN, A. R. O.; ANDERSON, R. J.; VREELAND, V. J.; DAVISON, I. R. (eds), PROCEEDINGS OF THE 17TH INTERNATIONAL SEAWEED SYMPOSIUM, Oxford University Press, Oxford, p. 169-174, 2003.

MARAIS, M. F.; JOSELEAU, J. P. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydr. Res.**, v. 336, p. 155-159, 2001.

MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). **J. Biotechnol.**, v. 89, p. 81-84, 2001.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Biores. Technol.**, v. 96, p. 379-382, 2005.

MARINHO-SORIANO, E.; SILVA, T. S. F.; MOREIRA, W. S. C. Seasonal variation in the biomass and agar yield from *Gracilaria cervicornis* and *Hydropuntia cornea* from Brazil. **Bioresource Technol.**, v. 77, p. 115-120, 2001.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M. L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 28, p. 395-399, 2001.

MATULEWICZ, M. C.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S. Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2937-2941, 1989.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, BIMALENDU. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, p. 87-95, 2002.

MEKHFI, H.; HAOUARI, M. E.; LEGSSYER, A.; BNOUHAM, M.; AZIZ, M.; ATMANI, F.; REMMAL, A.; ZIYYAT, A. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 317-322, 2004.

MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A. S. Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 20824-20835, 2004.

MELO, M. R. S. Isolamento, caracterização e aplicação biotecnológica de carboidratos das algas marinhas vermelhas *Agardhiella ramosissima* (Harv.) Kylin e *Gracilaria cornea* J. Agardh. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, Fortaleza, 2001.

MELO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; DE PAULA, R. C. M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydr. Polym.**, v. 49, p. 491-498, 2002.

MILLER, I. J.; BLUNT, J. W. Desulfation of algal galactans. **Carbohydr. Res.**, v. 309, p. 39-43, 1998.

MOLLET, J. C.; RAHAOUI, A.; LEMOINE, Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). **J. Applied Phycol.**, v. 10, p. 59-66, 1998.

MURANO, E. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **J. Applied Phycol.**, v. 7, p. 245-254, 1995.

MURANO, E.; TOFFANIN, R.; CECERE, E.; RIZZO, R.; KNUTSEN, S.H. Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiella subulata* from Mar Piccolo, Taranto. **Mar. Chem.**, v. 58, p. 319-325, 1997.

MURANO, E.; TOFFANIN, R.; ZANETTI, F. Chemical and macromolecular characterisation of Agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Polym.**, v. 18, p. 171-178, 1992.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.**, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NAVARRO, D. A.; STORTZ, C. A. Determination of the configuration of 3,6-anhydrogalactose and cyclizable α -galactose 6-sulfate units in red seaweed galactanas. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 2111-2118, 2003.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the Brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, p. 791-796, 1991.

NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carragenans – II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated β -D-galactose units. **Carbohydr. Polym.**, v. 26, p. 1-3, 1995.

NOSEDA, M. D.; VIANA, A. G.; DUARTE, M. E. R.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carragenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. **Carbohydr. Polym.**, v. 42, p. 301-305, 2000.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I. M.; COIMBRA, T. L. M.; GORIN, P. A. J.; SIERAKOWSKI, M. R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antivir. Res.**, v. 60, p. 201-208, 2003.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: **The Polysaccharides**; ASPINALL, G. O., Ed., 1st ed.; New York: Academic Press, 1983; v. 2, p 195-285.

PERCIVAL, E.G.V. Carbohydrate sulphate. **Quart. Rev.**, v. 3, p. 369-384, 1949.

PEREIRA, M. S. Ação anticoagulante de galactanas sulfatadas: estrutura química *versus* atividade biológica. **Tese de Doutorado**, Departamento de Bioquímica Médica da UFRJ, Rio de Janeiro, 2002.

PEREIRA, M. S.; MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 7656-7667, 1999.

PICULELL, L. Gelling Carrageenans. In: STEPHEN, A.M. **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker. Inc., 1995. p. 205-244.

PRADO-FERNÁNDEZ, J.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, J. A.; TOJO, E.; ANDRADE, J. M. Quantitation of κ -, ι - and λ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Anal. Chim. Acta**, v. 480, p. 23-37, 2003.

PRASAD, N. J.; FURNEAUX, R. H.; HEMMINGSON, J. A.; MILLER, I. J.; PICKERING, T. D.; SOTHEESWARAN, S. The carrageenan from the tropical South Pacific red seaweed *Meristotheca procumbens* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Rotuma Island. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SEAWEED SYMPOSIUM CAPE TOWN, 17., 2001. Cape Town: Chapman, R. O.; Anderson, R. J.; Vreeland, V. J.; Davison, I. R., 2001. p. 193-200.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M. Comparative analysis of sulfated galactanas from red algae by reductive hydrolysis and mild methanolysis coupled to two different HPLC techniques. **J. Applied Phycol.**, v. 10, p. 75-81, 1998.

RAMANA, K. S.; RAO, E. V. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Cladophora socialis*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 259-262, 1991.

RAND, M. L.; HARFENIST, E. J.; MURRAY, R. K. Proteínas plasmáticas, imunoglobulinas & coagulação sangüínea. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica**. 8ª ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 707-731.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Hemostasia e trombose. In: **Farmacologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 255-266, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 906 p.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. **Bot. Mar.**, v. 29, p. 335-340, 1986.

SARRAY, S.; SRAIRI, N.; HATMI, M.; LUIS, J.; LOUZIR, H.; REGAYA, I.; SLEMA, H.; MARVALDI, J.; AYEB, M. E.; MARRAKCHI, N. Lebecetin, a potent antiplatelet C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1651, p. 30-40, 2003.

SIDDHANTA, A. K.; SHANMUGAM, M.; MODY, K. H.; GOSWAMI, A. M.; RAMAVAT, B. K. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 26, p. 151-154, 1999.

SILVA, D. C. Estudos bioquímicos de componentes moleculares da alga *Bryothamnion seaforthii* Turner (Kütz) e seus efeitos no processo de ativação de plaquetas humanas. **Monografia**, Departamento de Biologia da UFC, Fortaleza, 2004.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **J. Applied Phycol.**, v. 16, p. 245-262, 2004.

STANLEY, N. Agars. In: STEPHEN, A.M. **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker. Inc., 1995. p. 187-204.

STEVENSON, T. T.; FURNEAUX, R. H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydr. Res.**, v. 210, p. 277-298, 1991.

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

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.**, v. 242, p. 217-227, 1993.

TAKANO, R.; SHIOMOTO, K.; KAMEI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Occurrence of carrageenan structure in an agar from the red seaweed *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales) with a short review of carrageenan-agarocolloid hybrid in the Florideophycidae. **Bot. Mar.**, v. 46, p. 142-150, 2003.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweed *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 34, p. 63-71, 2004.

TERRA, P. **Coagulação, Interpretação Clínica dos Testes Laboratoriais de Rotina**. 3^a ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 225 p.

THOMAS, D. P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding? **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1422-1425, 1997.

TRENTO, F.; CATTANEO, F.; PESCADOR, R.; PORTA, R.; FERRO, L. Antithrombin activity of an algal polysaccharide. **Thromb. Res.**, v. 102, p. 457-465, 2001.

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

USOV, A. I.; BILAN, M. I.; SHASHKOV, A. S. Structure of sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). **Carbohydr. Res.**, v. 303, p. 93-102, 1997.

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

USOV, A. I.; IVANOVA, E. G.; SHASHKOV, A. S. Polysaccharides of algae. XXXIII: Isolation and ^{13}C -NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan sea red seaweeds. **Bot. Mar.**, v. 26, p. 285-294, 1983.

USOV, A. I.; SHASHKOV, A. S. XXXIV: Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ^{13}C -NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, v. 28, p. 367-373, 1985.

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

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VAN DE VELDE, F.; PEPELMAN, H. A.; ROLLEMA, H. S.; TROMP, R. H. On the structure of κ/ι -hybrid carrageenans. **Carbohydr. Res.**, v. 331, p. 271-283, 2001.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **ALGAE: an introduction to phycology**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 627 p.

VIANA, A. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. **Carbohydr. Polym.**, v. 58, p. 455-460, 2004.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, p. 139-145, 2004.

VILLANUEVA, R. D.; MENDOZA, W. G.; RODRIGUESA, M. R. C.; ROMERO, J. B.; MONTAÑO, M. N. E. Structure and functional performance of gigartinacean kappa-iota

hybrid carrageenan and solieriacean kappa-iota carrageenan blends. **Food Hydrocol.**, v. 18, p. 283-292, 2004.

VILLANUEVA, R. D.; PAGBA, C. V.; MONTAÑO, N. E. Optimized Agar Extraction from *Gracilaria eucheumoides*. **Bot. Mar.**, v. 40, p. 369-372, 1997.

VILLANUEVA, R.; MONTAÑO, N. Highly methylated Agar from *Gracilaria edulis* (Gracilariales, Rhodophyta). **J. Applied Phycol.**, v. 11, p. 225-227, 1999.

WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. 4th ed. revised. Londres: McGraw-Hill Book Company, 1986. 264 p.

YAPHE, W. Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algae polysaccharides. **Anal. Chem.**, v. 32, p. 1327-1330, 1960.

YENIGÜL, M. Seasonal changes in the chemical and gelling characteristics of agar from *Gracilaria verrucosa* collected in Turkey. **Hydrobiologia**, v. 260/261, p. 627-631, 1993.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacol. Res.**, v. 50, p. 47-53, 2004.

ZIBETTI, R. G. M. Determinação da estrutura química de galactanas híbridas-D/L isoladas da alga vermelha *Cryptonemia crenulata* (Cryptonemiales, Rhodophyta). **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, 2001.

ZIBETTI, R. G. M.; NOSEDA, M. D.; CERREZO, A. S.; DUARTE, M. E. R. The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and the structure of two major fractions. Kinetic studies on the alkaline cyclization of the unusual dial G2S→D(L)6S. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 711-722, 2005.