

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

POLISSACARÍDEO DA PALMA GIGANTE

(*Opuntia ficus indica*, Mill):

PROPRIEDADES E ESTRUTURA.

Felix Guillermo Reyes Reyes
Bacharel em Química

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Anna Bobbio

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

- 1978 -

Dedicatōria

A Bete e
a Luciana

ÍNDICE

	página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
3. MATERIAL	19
4. MÉTODOS E RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	73
7. RESUMO	75
8. SUMMARY	76
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
10. AGRADECIMENTOS	87

INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos, compostos capazes de formar e estabilizar soluções coloidais, encontram largo campo de aplicação na indústria de alimentos para a formação de geis, como espessantes e em emulsões.

Além da celulose e do amido, a primeira usada unicamente após modificações químicas, a indústria de alimentos usa outros polissacarídeos naturais extraídos de plantas terrestres e aquáticas, - porém poucos são produzidos no Brasil e poucas também são as fontes naturais econômicas de tais produtos. Consequentemente - torna-se importante o estudo de novas fontes e novos polissacarídeos de possível uso em alimentos.

No presente trabalho procurou-se estudar um polissacarídeo extraído de uma fonte ainda não explorada como são os cactus do genero *Opuntia* abundantes na região nordeste do Brasil, os quais contêm uma mucilagem altamente viscosa que poderia ser utilizada industrialmente como agente espessante. O polissacarídeo purificado - foi submetido a estudos cujo objetivo era elucidar a sua composição e estrutura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Em 1929 SANDS e KLAAS (1) estudaram a estrutura de um polissacarídeo constituinte da goma "cholla" (a mucilagem do cactus *Opuntia fulgida*). Através da hidrólise ácida gradativa da goma os autores conseguiram purificar e posteriormente identificar os seguintes monossacarídeos: L-arabinose, D-galactose, L-ramnose e ácido D-galacturônico. Os monossacarídeos foram identificados pelas suas constantes físicas e pelos derivados preparados.

A mesma mucilagem foi estudada mais detalhadamente por BROWN , HIRST e JONES (2) em 1949. O polissacarídeo foi extraído com solução aquosa diluída de hidróxido de sódio da qual foi precipitado com metanol. O polissacarídeo purificado apresentou somente um componente quando submetido a eletroforese. Após hidrólise ácida do polissacarídeo, os autores identificaram os seguintes monossacarídeos, nas seguintes proporções: L-arabinose (6 partes); D-xilose (2 partes); L-ramnose (traços); D-galactose (3 partes) e ácido D-galacturônico (1 parte). A separação, identificação e quantificação dos monossacarídeos constituintes do polissacarídeo foram efetuadas por cromatografia em papel. Os referidos autores também obtiveram informações relativas às posições em que se da-

vam as ligações dos vários monossacarídeos, pela identificação dos produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado. Utilizando extração por solventes e destilação fracionada, os seguintes açúcares foram isolados e posteriormente identificados pelas suas constantes físicas, nas seguintes proporções moleculares- (valores aproximados): 2,3,5-tri-O-metil-L-arabinose (4 moles); 2,3,4-tri-O-metil-D-xilose (2 moles); 2,4-di-O-metil-D-galactose (3 moles); L-arabinose (1 mol) e ácido 2-O-metil-D-galacturônico (1 mol). Dos resultados obtidos, BROWN et al (2) concluíram que: (1) a D-xilose se encontrava no polissacarídeo na forma piranosídica e como unidade terminal da cadeia; (2) que a L-arabinose se encontrava na forma furanosídica e que uma parte deste açúcar estava presente como unidade terminal e outra parte estava substituída nos C-1, C-2, C-3 e C-5; (3) que possivelmente as unidades de D-galactose estavam ligadas entre si através de ligações glicosídicas 1→3 e 1→6 e finalmente que as unidades de ácidos urônicos possuíam substituintes nas posições: C-1, C-3 e C-4.

FERNANDEZ (3) efetuou uma série de análises químicas nas "raquetes" e no fruto da *Opuntia ficus indica*. O referido autor sugeriu a possibilidade de utilização das "raquetes" como alimento

forageiro para gado. Também foi estudada a possibilidade de extração e fermentação alcoólica dos açúcares contidos no fruto e a viabilidade econômica da extração do óleo da semente.

ALDERETE (4) em 1955 verificou que a massa mucilagínosa extraída das "raquetes" da *Opuntia quimilo*, da *Opuntia ficus indica*, da *Opuntia kiska-loro*, do *Cereus validus* e a massa fibrosa da *Cereus coryne* poderiam ser usadas para clarificar a água que contêm partículas de terra em suspensão, tornando-a própria para consumo humano. O autor também verificou que a mucilagem e especialmente a massa fibrosa das espécies de cactus citadas anteriormente, absorvem das soluções aquosas os seguintes compostos: ácido acético, glucose, azul de metileno e eosina.

MELLA (5) realizou um estudo bromatológico em frutos da *Opuntia ficus indica* M. e da *Pyrus communis*. Todas as amostras analisadas pelo autor eram originárias das províncias de Santiago e Valparaíso, Chile. Para os frutos da *Opuntia ficus indica* o autor obteve os resultados indicados nas Tabelas 1 e 2. Pelos resultados obtidos, MELLA concluiu que o fruto da *Opuntia ficus indica* possui alto valor nutritivo pelo seu conteúdo em sais minerais e vitaminas.

TABELA 1. Resultados das Análises Químicas Efetuadas em Frutos da *Opuntia ficus indica* M., segundo Mella (5).

Análise	g/100 g de parte comestível
Umidade	81,4
Proteínas (N x 6,25)	1,05
Resíduo celulósico	3,1
Extrato etéreo	0,43
Extrato não nitrogenado	13,47
Cinzas	0,52

TABELA 2. Resultados das Análises de Minerais e Vitaminas Efetuados em Frutos da *Opuntia ficus indica* M., segundo Mella (5).

Análise	mg/100 g de parte comestível
Cálcio	57,3
Fósforo	32,0
Ferro	1,23
Sódio	2,01
Potássio	156,9
Tiamina	0,010
Riboflavina	0,022
Niacina	0,26
Ácido Ascórbico	18,4

CAMPELLO e CORRÊA (6) publicaram, em 1960, um estudo sobre o cultivo e a utilização das cactaceas forrageiras sem espinhos. No referido trabalho os autores procuraram estudar a classificação botânica das cactaceas existentes na região seca de Pernambuco e a forma pela qual deve se processar o arraçoamento do gado com a palma. Os autores também apresentaram um breve histórico a respeito da introdução das palmatórias no nordeste brasileiro e concluíram que "é indiscutível a necessidade de fomentar o mais intensamente possível a cultura das palmatórias na zona seca de Pernambuco, a fim de que o sertanejo e o seu gado não pereçam".

Posteriormente, CORRÊA (7) em 1963, publicou uma revisão bibliográfica sobre três cactaceas vulgarmente denominadas "palmas" - empregadas nas áreas do nordeste brasileiro como forrageiras para gado bovino. As palmas estudadas foram: "palma gigante" (*Opuntia ficus indica* Mill.); "palma redonda", talvez uma variação da anterior e "palma doce" ou "palma miúda" (*Nopalea cochenillifera* (L) S.D.). O autor inicialmente apresentou uma revisão da literatura correlata e, em seguida, procurou caracterizar os principais núcleos de cultura das palmas no nordeste. O autor também discutiu as publicações a respeito do valor nutritivo das palmas e apresentou os resultados experimentais obtidos pelo Ins

tituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco visando resolver - alguns dos problemas da cultura das três cactaceas citadas anteriormente.

VILLAREAL, MENDOZA, ARELLANO e MORENO (8) em 1963 publicaram os dados obtidos a respeito de algumas propriedades químicas de seis espécies diferentes de cactus do gênero *Opuntia* (Tabela 3). Em base aos resultados obtidos os autores discutiram a seleção de espécies de cactus para a possível utilização como fonte de pectina e celulose.

TABELA 3. Propriedades Químicas das "Raquetes" de Cactus de Várias Espécies Segundo VILLAREAL; MENDOZA; ARELLANO e MORENO (8).

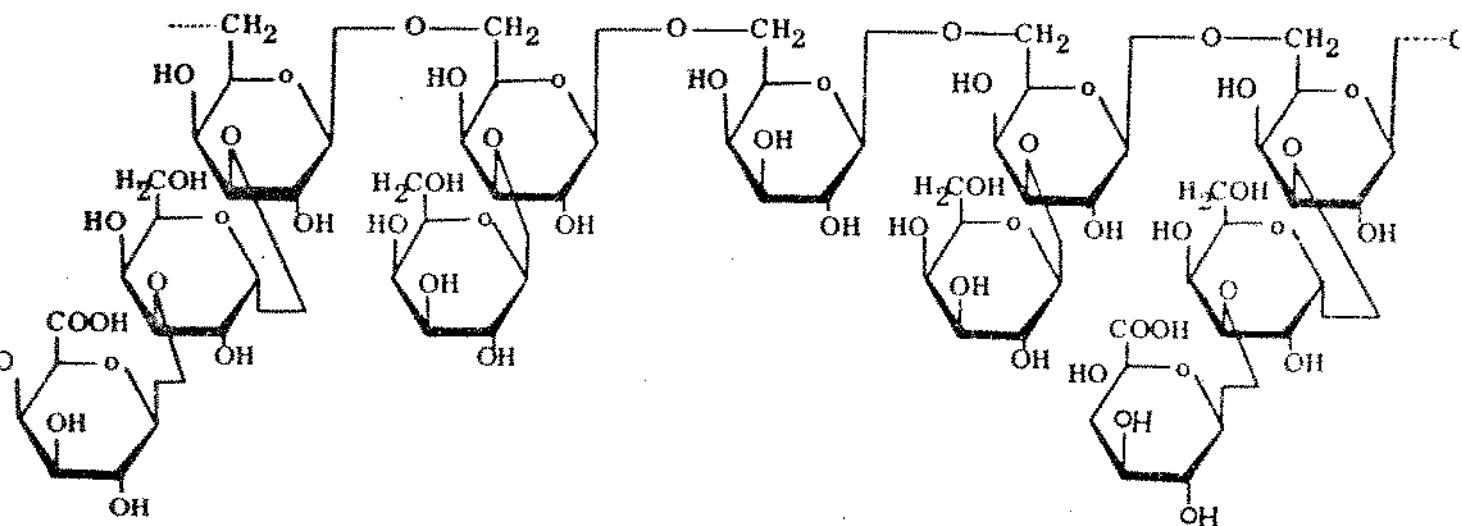
Espécie	Nome Científico	Sólidos Solúveis O ₂ rix	Sólidos Totais %	Acidez Total (ácido cítrico) %	pH	Cinzas (base seca) %	Pectina Total (base seca) %	Celulose (base seca) %
Apastillada	<i>O. ficus indica</i>	7,7	13,8	0,12	5,10	15,2	13,84	81,88
Camuesa	<i>O. robusta</i>	7,2	12,4	0,41	4,78	20,1	26,61	46,93
Cardona	<i>O. streptacantha</i>	7,7	14,7	0,48	4,88	27,2	6,59	18,57
Fafayuco	<i>O. amygdala</i>	8,1	14,6	0,57	4,80	19,8	9,58	63,01
Blanca I	<i>O. spp</i>	7,1	12,5	0,25	4,80	26,8	7,60	37,84
Verde	<i>O. ficus indica</i>	7,6	13,1	0,36	4,75	25,9	8,39	39,69
Amarilla	<i>O. magacantha</i>	8,6	17,0	0,20	4,81	21,1	5,06	50,10
Blanca II	<i>O. spp</i>	7,3	11,9	0,31	4,90	34,4	7,05	37,63

VILLAREAL, ALVA e ROMERO em 1964 (9) publicaram os estudos feitos com o suco extraído do fruto de diferentes espécies de cactus *Opuntia* : *O. megacantha*; *O. spp.*; *O. streptacantha*; *O. larreji*; *O. amyelaea*; e *O. ficus indica*. O estudo foi efetuado com o objetivo de determinar as melhores condições de processamento e estudar a qualidade dos sucos enlatados. Pelos resultados obtidos, os referidos autores concluíram que o suco extraído do fruto da *O. streptacantha* é o que apresentava as melhores características para enlatamento, sendo relativamente alto o seu conteúdo em sólidos totais (18,3%); pectina (2,0% base seca), vitamina C (45 mg%) e carotenóides (0,3 mg%).

Em 1966 PARIKH e JONES publicaram dois artigos a respeito da goma "cholla" (*Opuntia fulgida*). No primeiro artigo (10), após hidrólise ácida total da goma e utilizando cromatografia em papel os autores isolaram, identificaram e determinaram, quantitativamente os seguintes monossacarídeos: L-arabinose (51,6%), D-galactose (31,7%), D-xilose (15,0%), L-ramnose (2-3%) e ácido D-galacturônico (11,2%). Após hidrólise parcial da goma com ácido sulfúrico a 3%, os autores isolaram (por cromatografia em coluna de celulose) e identificaram (com base nos resultados da cromatografia em papel, das constantes físicas e pelos derivados preparados) o seguinte dissacarídeo: 3-0-(ácido β, D-galacto-

piranosil urônico) - D-galactose. Após outra hidrólise com ácido sulfúrico 6 N a temperatura ambiente (20-23°C) durante 23 dias, PARIKH e JONES obtiveram uma mistura de mono e oligossacarídeos e um polímero degradado o qual após hidrólise ácida apresentou, na cromatografia em papel, dois componentes principais: galactose e ácido galacturônico na relação de 9:2 respectivamente. O polissacarídeo degradado foi metilado e após hidrólise ácida foram separados por cromatografia em papel e posteriormente identificados os seguintes açúcares metilados: 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose; 2,3,4-tri-O-metil-D-galactose; 2,4,6-tri-O-metil-D-galactose; 2,4-di-O-metil-D-galactose e ácido 2,3,4-tri-O-metil-D-galacturônico. Após oxidação do polissacarídeo degradado com ácido periódico e posterior redução e hidrólise, os autores identificaram, por cromatografia em papel, os seguintes compostos: D-galactose, glicolaldeído, glicerol e ácido glicerônico. Baseados nestes resultados os autores propuseram uma possível estrutura básica para o polissacarídeo degradado pela qual as unidades de galactose estariam unidas entre si através de ligações glicosídicas 1→6 e 1→3 (Figura 1).

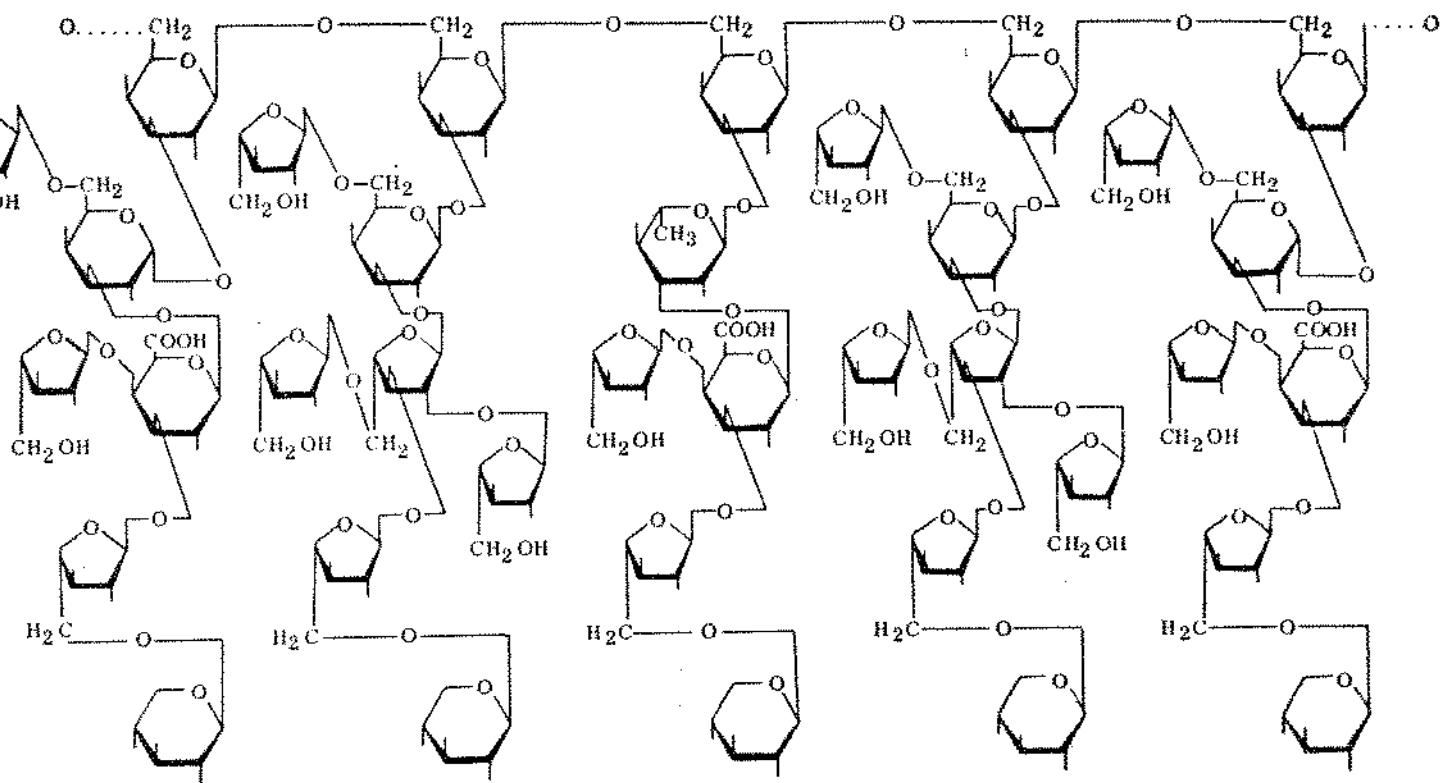
FIGURA 1. Estrutura proposta para a "unidade básica" do polisacarídeo degradado da goma "cholla", segundo PARIKH e JONES (10).



Em seu segundo artigo sobre a goma "cholla" PARIKH e JONES (11) identificaram os oligossacarídeos obtidos durante a hidrólise - ácida parcial da goma(10). Os oligossacarídeos foram separados por cromatografia em papel e identificados (com base nos dados-

da cromatografia, das constantes físicas e pelos derivados preparados) como: 6-O-β-D-galactopiranosil-D-galactose; 3-O-β-D-galactopiranosil-D-galactose; 3-O-α-L-arabinofuranosil-L-arabinose; 5-O-β-D-xilopiranosil-L-arabinose; 3-O-β-D-galactopiranosil-L-arabinose e um novo trissacarídeo: 0-β-D-xilopiranosil (1→5)-0-α-L-arabinofuranosil (1→3) L-arabinose. Após oxidação do polissacarídeo com metaperiodato de sódio e posterior redução e hidrólise, os autores identificaram por cromatografia em papel, os seguintes compostos: D-galactose, glicerol, glicolaldeído, ácido D-galacturônico; L-arabinose; etileno glicol e L-ramnose. Baseados nos resultados obtidos neste e nos outros trabalhos publicados anteriormente (1,2 e 10) os autores propuseram uma possível estrutura para a "unidade básica" do polissacarídeo (Figura 2).

FIGURA 2. Estrutura proposta para a "unidade básica" do polisacarídeo da goma "cholla", segundo PARIKH e JONES - (11).



AMIN, AWAD e EL-SAYED (12) publicaram, em 1970, os resultados dos estudos feitos com amucilagem extraída das "raquetes" da *Opuntia ficus indica*. A mucilagem foi isolada pela extração das "raque -

tes" com ácido clorídrico 0,1 M e posterior precipitação com acetona; o precipitado obtido era pouco solúvel em água. Após hidrólise ácida da mucilagem os autores identificaram, por cromatografia em papel, os seguintes açúcares nas porcentagens indicadas: arabinose, 37,5%; galactose, 35,7%; xilose, 15,5% e ramnose, 11,5%. Após metilação e hidrólise da mucilagem os autores identificaram, pela comparação dos valores de R_g obtidos pela cromatografia em papel, dois componentes principais: 2,3,5-tri-O-metil-arabinose e 2,3,6-tri-O-metil galactose e em menor quantidade mais dois componentes: 2,4-di-O-metil galactose e 3,4-di-O-metil ramnose. Com base nos resultados obtidos na dosagem do ácido fórmico - produzido durante a oxidação do polissacarídeo com periodato de sódio, os autores concluíram que o polissacarídeo era constituído por cadeias de aproximadamente 55 unidades de açúcares.

OSPINA (13) publicou em 1971 os dados relativos à distribuição-geográfica e a composição química do fruto da *Opuntia ospinae* cultivada na região de Bogotá, Colômbia. O autor verificou que a polpa do fruto pode ser considerada um alimento ácido por apresentar pH de 3,6 e que possui alto conteúdo de substâncias nitrogenadas (7,47% base seca). No suco extraído do fruto, OSPINA identificou, por cromatografia em papel, unicamente levulose. O autor também estudou a identidade do pigmento contido na polpa

do fruto não chegando a identificá-lo.

ESPINOSA e colaboradores (14), em 1973, estudaram a composição e a possibilidade de processamento do suco obtido do fruto de duas variedades de *Opuntia ficus indica*. No suco os autores identificaram os seguintes açúcares solúveis: frutose, galactose e glicose. A porcentagem de açúcares redutores totais foi de 9-14% dependendo do estágio de maturação do fruto. O pH do suco variou entre 5,8 a 6,3 e tanto o suco quanto o fruto mostraram-se susceptíveis a deterioração bacteriana. Os autores concluíram que o suco requer adição de ácido para sua melhor preservação.

SRIVASTAVA e PAUDE (15) em 1974 isolaram e caracterizaram um polissacarídeo extraído da *Opuntia dillenii*. Após hidrólise ácida do polissacarídeo os autores identificaram (por cromatografia em papel e em camada delgada, pelas constantes físicas e pelos derivados preparados) os seguintes açúcares: D-galactose e L-arabinose na relação molar de 3:1 respectivamente. No hidrolizado do polissacarídeo metilado os autores identificaram (por cromatografia em papel, pelas constantes físicas e pelos derivados preparados) os seguintes açúcares metilados: 2,6-di-O-metil-D-galactose; 2,3,6-tri-O-metil-D-galactose, 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose e 2,3,5-tri-O-metil-L-arabinose. Com base nestes dados e nos resultados obtidos após oxidação do polissacarídeo com pe

riodato de sódio, os autores propuseram uma possível estrutura para a arabinogalactana na qual a cadeia principal era formada por unidades de D-galactopiranosose unidas entre si através - de ligações glicosídicas β -1+4.

GARCIA, SOLER e BARBA (16) em 1975 isolaram e purificaram um dissacarídeo encontrado no fruto maduro da *Opuntia ficus indi*ca. A partir da análise elementar, dos resultados da cromatografia em papel, da formação da osazona, dos resultados obtidos pela metilação e finalmente pelo espectro infravermelho, os autores identificaram o dissacarídeo como sendo isomaltose (O- α -D-glucopiranosil-1+6-D-glucopiranosose). Os referidos autores propuseram o nome de Opuntiosa para o dissacarídeo estudado em substituição ao de isomaltose.

MINDT e colaboradores (17) em 1975 publicaram um artigo a res - peito da composição da mucilagem obtida de quatro espécies diferentes de cactus: *Opuntia monocantha*, *Opuntia nopalea-coccinilli*fera, *Cereus peruvianus* e *Wigginsia erinacea*. Em todas as mucilagens os autores identificaram, por cromatografia em papel, âcido galacturônico como um dos principais componentes. A porcentagem de ácido galacturônico variou de 20% para *O. nopalea-cocci*nillifera a 51% para *W. erinacea*. Após a hidrôlise das mucilagens de cada uma das *Opuntias* foram identificados, por cromato

grafia em papel, ramnose, arabinose, galactose e xilose. Da mesma maneira nas mucilagens da *C. peruvianus* e *W. orinacea* foram identificados: ramnose, arabinose e galactose. Os referidos autores também metilaram e identificaram, por cromatografia em papel e por cromatografia gasosa - espectrometria de massas, os produtos de hidrólise de cada uma das mucilagens metiladas. Com base nos resultados obtidos os autores sugeriram uma similaridade estrutural entre os polissacarídeos de cactus e as gomas exudadas pelas espécies *Sterculia* e *Khaya*.

LERCKER, LERICI e CAPELLA (18) em 1976 isolaram e identificaram, por cromatografia gasosa, os açúcares solúveis e os lipídeos presentes no fruto do figo da Índia (cactus *Opuntia*). Os açúcares foram identificados como sendo principalmente glucose e frutose e em menor quantidade sacarose. A composição dos ácidos graxos extraídos das sementes do fruto mostrou-se muito similar ao óleo extraído das sementes da uva, particularmente pelo alto conteúdo de ácido linoleico (56,0%). Dos dados obtidos, os autores concluíram que a composição do óleo extraído da semente do cactus *Opuntia*, não evidencia a presença de qualquer composto que possa impedir seu uso na alimentação humana e sugeriram que o cactus *Opuntia* seja considerado como uma fonte de alimento do tipo não convencional.

3. MATERIAL

3.1. Amostras da Palma.

As "raquetes" da palma gigante utilizadas neste trabalho foram colhidas de plantas existentes na Estação Experimental Central de Nova Odessa do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. As referidas plantas pertencem à família das Cactaceas, gênero *Opuntia*, espécie *ficus indica* (Mill) e são originárias de mudas trazidas da região nordeste do Brasil.

Para a extração da mucilagem foram escolhidas "raquetes" bem desenvolvidas e que apresentaram as características físico-químicas expressas na Tabela 4. As "raquetes" utilizadas eram semelhantes às aquelas mostradas na Figura 3.

TABELA 4.* Características físico-químicas das "raquetes" da *Opuntia ficus indica* Mill.

Peso Unitário (g)	1000
Comprimento (mm)	370
Largura (mm)	160
Espessura (mm)	20
Umidade (%)	92,3
Proteína (%) (N x 6,25)	0,91
Extrato etéreo (%)	0,23
Cinzas (%)	1,43
Fibra (%)	2,46
Extrativos não Nitrogenados (%)	2,67

* As características físicas representam a média de 5 medidas efetuadas em amostras diferentes. As características químicas representam a média de 3 determinações.

FIGURA 3. Fotografia de "raquetes" da Palma Gigante .
(Nova Odessa).



3.2. Reagentes.

O etanol absoluto era produto comercial com 99,5% de álcool. Os açúcares utilizados na preparação de derivados padrões foram todos produtos puros para análise da marca MERCK.

A 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucose foi preparada em nosso laboratório pela metilação exaustiva da D-glucose segundo o método de WALKER, MILDRED e Mc CREADY (19), com posterior hidrólise ácida do grupo metila do carbono redutor (20). A pureza da 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucose obtida foi verificada por cromatografia em camada delgada utilizando placas de sílica gel G. Os solventes utilizados e os valores encontrados na medida de R_f , juntamente com valores obtidos da literatura estão apresentados na Tabela 5.

O ácido D-galactárico foi preparado a partir da D-galactose segundo o método descrito por LEWIS, SMITH e STEPHEN (23).

As fenilosazonas da D-xilose, L-arabinose e D-galactose foram preparadas de acordo com o método descrito por SHRINER e FUSON (24).

Os demais reagentes utilizados neste trabalho foram produtos prontos para análise das marcas MERCK, CARLO ERBA ou BAKER.

TABELA 5. Valores de R_f da 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucose.

S O L V E N T E S (v/v)			
Benzeno	200		
Etanol	47	Diisopropil éter	83
H ₂ O	15	Metanol	17
NH ₄ OH	1		
R_f Determ.	R_f^* Literat.	R_f Determ.	R_f^{**} Literat.
37	38	44	45

* Segundo HAY, LEWIS & SMITH (21)

** Segundo LEWIS & SMITH em STAHL (22(a))

3.3. Aparelhos.

- Espectofotômetro ultravioleta-visível Varian Techtron, modelo 635 - D.
- Balança Mettler modelo H-34.
- Espectofotômetro Pye Unicam, modelo SP 1000.
- Conjunto de eletroforese Savant Instruments, Inc., modelo HV 5000 A.
- Centrífuga International, modelo K.
- Potenciômetro Metrohn Herisau E 512 com microeletrodo com binado.
- Evaporador rotatório Buchler Instruments, Inc.
- Estufa FANEM, modelo 320/1.
- Viscosímetro tipo CANNON-FENSKE nº 50 V 94, para líquidos opacos.
- Liofilizador Virtis modelo nº 10-146MR-BA.
- Conjunto para determinação de ponto de fusão Mettler, modelo FP52.

4. MÉTODOS E RESULTADOS

4.1. Métodos Químicos de Análise.

4.1.1. Umidade

A umidade foi determinada segundo o método 7.003 da AOAC (25).

4.1.2. Proteína

Utilizou-se o método 42.016 da AOAC (25). Nos cálculos - usou-se o fator 6,25 para a conversão de nitrogênio total em proteína.

4.1.3. Cinzas

A determinação foi feita segundo o método 7.010 da AOAC - (25).

4.1.4. Fibra Crua

Seguiu-se o método 7.057 da AOAC (25).

4.1.5. Extrato Etéreo

Foi determinado segundo o método 7.048 da AOAC (25).

4.1.6. Teste de FEHLING

Foi efetuado segundo o procedimento descrito por LITWACK (27).

4.1.7. Teste de Biureto

Procedeu-se de acordo com o método 22.013 da AOAC (26).

4.1.8. Teste para Ácidos Urônicos

Foi efetuada a reação de ácidos hexurônicos com carba-zol e ácido sulfúrico de acordo com o método descrito por DISCHE (28).

4.1.9. Teste para Peroxidasas

Foi efetuado segundo o método descrito por HUNTER (29).

4.2. Reagentes de Coloração Utilizados na Cromatografia em Cama-da Delgada e em Papel.

4.2.1. p-Anisidina - ácido ftálico

Preparado segundo o método descrito por KREBS, HEUSSER e WIMMER, reagente nº 12 em STAHL (30).

4.2.2. Nitrato de prata - hidróxido de sódio

Foi preparado de acordo ao procedimento descrito por

KREBS, HEUSSER e WIMMER, reagente nº 234 em STAHL (30).

4.2.3. Anilina - difenilamina - ácido fosfórico

Foi preparado segundo o método descrito por KREBS, HEUSSER e WIMMER, reagente nº 8 em STAHL (30).

4.2.4. Azul de bromofenol

Reagente preparado de acordo ao procedimento descrito por PETROWITZ e PATUSKA (31).

4.3. Métodos Utilizados e Resultados Obtidos no Estudo do Polissacarídeo.

4.3.1. Extração e Precipitação da Mucilagem das "Raquetes" da Palma.

Raquetes da palma foram cortadas em pequenos pedaços de aproximadamente 3 x 3 cm e imediatamente escaldados com vapor de água durante 15 minutos, este tempo foi suficiente para inativar peroxidases. Em seguida o material foi triturado em liquidificador com mínima adição de água. A mistura viscosa obtida foi coada em pano fino e as fibras residuais extraídas mais duas vezes com pequena adição de água. Aos extratos aquosos reunidos foi adicionado etanol absoluto até não mais haver formação perceptível de precipitado ao adicionar mais etanol. A mistura foi deixa

da em repouso durante 20 horas e após esse período coada em pano fino. O filtrado hidroalcoólico continha 67% v/v de etanol a 15°C e foi posteriormente utilizado para obtenção dos açúcares solúveis. O precipitado, de cor levemente esverdeada, foi lavado com etanol 80% v/v até eliminação da pigmentação, seguido de etanol absoluto e finalmente seco a 45-50°C em estufa com circulação de ar. A porcentagem de precipitado bruto obtido foi de 3,4% (em base a palma úmida) e apresentou as seguintes características:

Teste de Fehling : negativo

Teste de Biureto : positivo

Proteína (N x 6,25) % : 9,6

Cinzas % : 12,88

4.3.2. Obtenção e Purificação dos Açúcares Solúveis da Palma.

O filtrado hidroalcoólico obtido em 4.3.1. foi concentrado à pressão reduzida à temperatura de 40°C, até um volume aproximado de 250 ml. O material concentrado foi clarificado por filtração com celite e o filtrado foi novamente concentrado a 40°C e a pressão reduzida até obter um xarope o qual foi extraído com acetona seguido de etanol 70%. O extrato etanólico foi concentrado à pressão reduzida à temperatura de 40°C, até volume aproximado de 30 ml e posteriormente desionizado passando-se a solução - por colunas de troca iônica AMBERLITE IR 120, forma H⁺, 28-35 mesh

e AMBERLITE IR 45, forma OH^- , 28-35 mesh. A solução que passou pelas colunas foi novamente concentrada à pressão reduzida e à temperatura de 40°C , até um volume aproximado de 25 ml. Este extrato foi utilizado na identificação dos carboidratos solúveis da palma.

4.3.3. Identificação dos Carboidratos Solúveis da Palma.

Os açúcares solúveis da palma, presentes no extrato obtido em 4.3.2, foram identificados por cromatografia em papel, no sentido descendente. Os solventes usados estão apresentados na Tabela 6. Após o desenvolvimento, os cromatogramas foram secos ao ar e revelados com solução de p-anisidina-ácido ftálico ou nitrato de prata-hidróxido de sódio. Em cada cromatograma, na amostra contendo o extrato dos açúcares solúveis foram reveladas unicamente 3 manchas, que por comparação com as manchas produzidas pelos açúcares padrões foram identificadas como: frutose, glucose e sacarose. Os valores dos R_f obtidos dos carboidratos solúveis da palma estão reunidos na Tabela 6.

TABELA 6. Valores de R_g^* dos Carboídratos Solúveis da Palma.

Carboídrato	Composição dos Solventes (v/v)				Coloração produzida pelo revelador p-anisidina - ácido ftálico
	Acetato de Etila 8	Piridina 2	Acetato de Etila 6	Propanol 7	
	H ₂ O (32)	H ₂ O 1	H ₂ O 2	H ₂ O (34)	
Frutose	147		123	117	verde musgo
Glucose	100		100	100	verde musgo
Sacarose	42		71	74	-

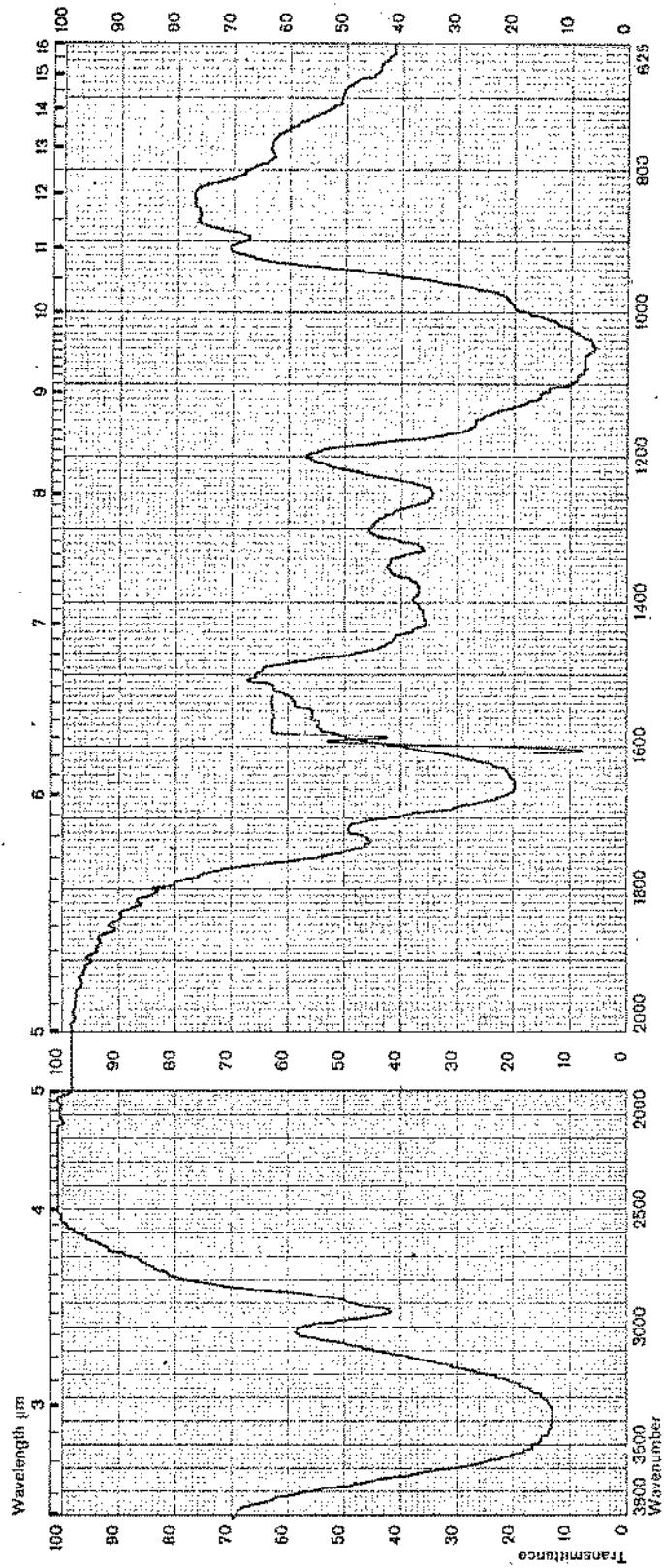
* Valores relativos a D-glucose (= 100).

4.3.4. Extração e Purificação do Polissacarídeo.

25 g do precipitado obtido em 4.3.1. foram adicionados a 2 litros de água destilada e a mistura agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após centrifugação a 1800 r.p.m., durante 10 minutos, o sobrenadante foi decantado e o precipitado novamente extraído com água e centrifugado até obter um sobrenadante transparente e incolor. Os sobrenadantes reunidos foram submetidos a desproteínização pelo método de SEVAG (35). Após a desproteínização o polissacarídeo foi precipitado da solução mediante a adição de 3 volumes de etanol absoluto para cada volume de líquido. A mistura foi deixada em repouso durante 20 horas e coada em pano fino. O polissacarídeo precipitado foi suspenso em água e a suspensão submetida a dialise segundo o método descrito por BINKLEY (36), após o que o material foi liofilizado. O espectro infravermelho do polissacarídeo liofilizado está apresentado na Figura 4. A porcentagem de polissacarídeo liofilizado obtida foi de 1,0% (em base a palma úmida) e apresentou as seguintes características:

Teste de Felhing	=	negativo
Teste de Biureto	=	negativo
Teste para Ácidos Urônicos	=	positivo
Cinzas (%)	=	0,34

FIGURA 4. Espectro infravermelho do polissacarídeo purificado obtido da palma gigante (KBr).



4.3.5. Eletroforese de Zona do Polissacarídeo.

A eletroforese do polissacarídeo obtido em 4.3.4 foi efetuada segundo o método descrito por NORTHCOTE (37), com as seguintes modificações: (a) o papel utilizado foi Whatman 3 MM; (b) as tiras de papel foram de 6 x 50 cm; (c) foram aplicados 40 mA durante 90 a 120 minutos e (d) as tiras de papel foram secas à temperatura ambiente, tratadas durante 10 minutos com solução a 1% de periodato de sódio, lavadas imediatamente com etanol 80%, secas novamente à temperatura ambiente e reveladas com nitrato de prata-hidróxido de sódio ou anilina-difenilamina. Em todas as tiras uma única mancha foi revelada.

4.3.6. Hidrólise Total do Polissacarídeo.

3,0 g do polissacarídeo obtido em 4.3.4 foram adicionados a 100 ml de ácido clorídrico 1 N e hidrolisados durante 7 horas em banho maria até obter teor de açúcares redutores constante, determinados pelo método de SOMOGYI - NELSON (38 e 39). A solução foi neutralizada com bicarbonato de sódio, concentrada à pressão reduzida, temperatura de 40°C, até um volume aproximado de 25 ml e posteriormente desionizada pela passagem em colunas de troca iônica de AMBERLITE IR 120, forma H⁺, 28-35 mesh e AMBERLITE IR 45, forma ⁻OH, 28-35 mesh. O material não retido nas colunas foi concentrado à pressão reduzida à temperatura de 45°C

atê um volume aproximado de 25 ml. Essa solução foi utilizada pa
ra a identificação e dosagem dos açúcares neutros.

O ácido urônico retido na coluna de AMBERLITE IR 45, foi eluido
com solução 0,4M de ácido fôrmico. O eluido foi concentrado ã
pressão reduzida, temperatura de 45°C, atê um volume aproximado-
de 10 ml. Esta solução foi utilizada para a identificação de aci
dos urônicos.

4.3.7. Identificação dos Produtos da Hidrôlise Total do Polissa- carídeo.

Os monossacarídeos neutros contidos no extrato obtido em 4.3.6 -
foram identificados por cromatografia em papel, no sentido des-
cendente. Os solventes utilizados estão apresentados na Tabela 7.
Os cromatogramas, do extrato contendo os produtos de hidrôlise do
polissacarídeo, apôs revelação apresentaram somente 3 manchas as
quais foram identificadas como xilose, arabinose e galactose .
Na Tabela 7 estão reunidos os valores dos R_g dos monossacarídeos
neutros constituintes do polissacarídeo.

O extrato obtido em 4.3.6 contendo os ácidos urônicos por cromato-
grafia em camada delgada utilizando placas de sílica gel e de
celulose, apresentou unicamente uma mancha a qual foi identifica
da como ácido galacturônico. Na Tabela 8 estão reunidos os solven

TABELA 7*. Valores de R_g dos Monossacarídeos Constituintes do Polissacarídeo.

	Composição dos Solventes (v/v)			Coloração produzida pelo revelador p-anisidina - ácido-ftálico
	Acetato de Etila 8 Piridina 2 Água (32)	Acetato de Etila 2 Piridina 1 Água 2 (40)	Acetato de Etila 6 Ácido Acético 3 Água 2 (33)	
Monossacarídeos				
Xilose	230	127	135	vermelho violeta
Arabinose	170	115	128	vermelho violeta
Galactose	79	91	92	verde musgo

* Valores de R_g relativos a D-glucose (= 100).

TABELA 8. Valores de R_f do Ácido D-galacturônico em Cromatografia em Camada Delgada de Sílica Gel e de Celulose.

Sílica Gel		Celulose			
n-Butanol	2	Piridina	36	Acetato de Etila	6
Ácido Acético	1	Acetato de Etila	36	Ácido Fórmico	2
Água	1	Ácido Acético	7	Água	2
		Água	21		
R_f Obs.	R_f^* Lit.	R_f Obs.	R_f^* Lit.	R_f Obs.	R_f^* Lit.
32	32	24	25	33	33

* Segundo LEWIS e SMITH, em STAHL (22(a))

tes utilizados e os valores de R_f obtidos, juntamente com valores encontrados na literatura (22(a)).

4.3.8. Dosagem dos Produtos da Hidrólise Total do Polissacarídeo.

O ácido galacturônico foi dosado utilizando o reagente de carbazol segundo o método descrito por McCOMB e McCREADY (41). Para o preparo da curva padrão foi utilizado ácido D-glucurônico. A porcentagem de ácido galacturônico determinada foi de 14,5%.

Para a dosagem dos açúcares neutros foram aplicados 200-400 μ l da solução de hidrólise obtida em 4.3.6, em papel Whatman 3 MN de 19 x 48 cm. Os cromatogramas foram desenvolvidos no sentido descendente utilizando como solvente acetato de etila-piridina-água (8:2:1 v/v). Após 28-30 horas de desenvolvimento os cromatogramas foram secos ao ar. Uma tira de 1 cm de largura foi cortada ao longo da parte central de cada cromatograma e revelada com p-anisidina-ácido ftálico. Os cromatogramas foram cortados em tiras obedecendo à localização de zonas reveladas pela tira central e de cada zona, por eluição com água, foi obtido um açúcar posteriormente dosado pelo método de SOMOGYI-NELSON (38 e 39). Para as dosagens foram usados quatro cromatogramas sendo que a média aritmética da porcentagem obtida para cada um dos monossacarídeos foi de 39,7, 33,0 e 12,8% respectivamente para galactose, arabinose e

xilose.

A recuperação de amostras padrões a partir de três cromatogramas feitos de forma idêntica ao acima descrito foi de 98,0 a 100,0 % para xilose, arabinose e galactose.

4.3.9. Preparação de Derivados dos Monossacarídeos Constituintes do Polissacarídeo.

A partir do extrato obtido em 4.3.6 e que contém o ácido galacturônico, por tratamento com água de bromo foi preparado ácido D-galactárico segundo o método descrito por McCREADY (42). O ponto de fusão do produto obtido bem como o ponto de fusão da mistura com uma amostra autêntica de ácido galactárico estão na Tabela 9. Para cada um dos açúcares neutros, contidos no extrato obtido em 4.3.6 e separados por cromatografia em papel segundo o método descrito em 4.3.8, foi preparada a fenilisazona de acordo com o método descrito por SHRINER e FUSON (24). O ponto de fusão de cada produto obtido e o ponto de fusão da mistura de cada uma das fenilosazonas com amostras autênticas de fenilosazonas preparadas com açúcares puros encontram-se na Tabela 9.

4.3.10. Hidrólise Gradativa do Polissacarídeo.

5,0 g do polissacarídeo obtido em 4.3.4. foram adicionados a 250 ml de água destilada e o pH da suspensão ajustado a 3,0 uti

TABELA 9. Ponto de Fusão e Ponto de Fusão de Mistura de Derivados Preparados a Partir dos Açúcares Constituintes do Polissacarídeo.

Açúcares	Derivado	Ponto de Fusão em °C do Derivado e de Misturas com Amostras padrões	Ponto de Fusão °C. Literatura
D-xilose	Fenilosazona	161,0 - 162,5	163 (27)
L-arabinose	Fenilosazona	163,6 - 165,5	166 (27)
D-galactose	Fenilosazona	189,3 - 191,8	185 > (43) 187 >
Ácido D-galacturônico	Ácido D-galactárico	214,5 - 215,8	214 (42)

lizando ácido clorídrico 4N. A suspensão foi aquecida em banho de água a 70°C. Após 4 horas de hidrólise foram adicionados, com agitação constante, 750 ml de etanol absoluto. O precipitado formado foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para identificação dos monossacarídeos. O precipitado foi submetido a hidrólises sucessivas do mesmo modo - como descrito acima, porém nos seguintes pH e intervalos de tempo de reação:

pH	Tempo (h)
2,5	20
2,0	88
1,8	88
1,6	20
1,6	20
1,6	26

Tempo total de hidrólise por amostra: 246

Os vários sobrenadantes foram concentrados à pressão reduzida, temperatura de 40°C. Os monossacarídeos foram identificados por cromatografia em camada delgada de sílica gel com os seguintes solventes: acetona-água (9:1 v/v) e n-butanol-ácido acético água (2:1:1 v/v). As placas foram secas ao ar e reveladas com solução de p-anisidina-ácido ftálico e de azul de bromofenol.

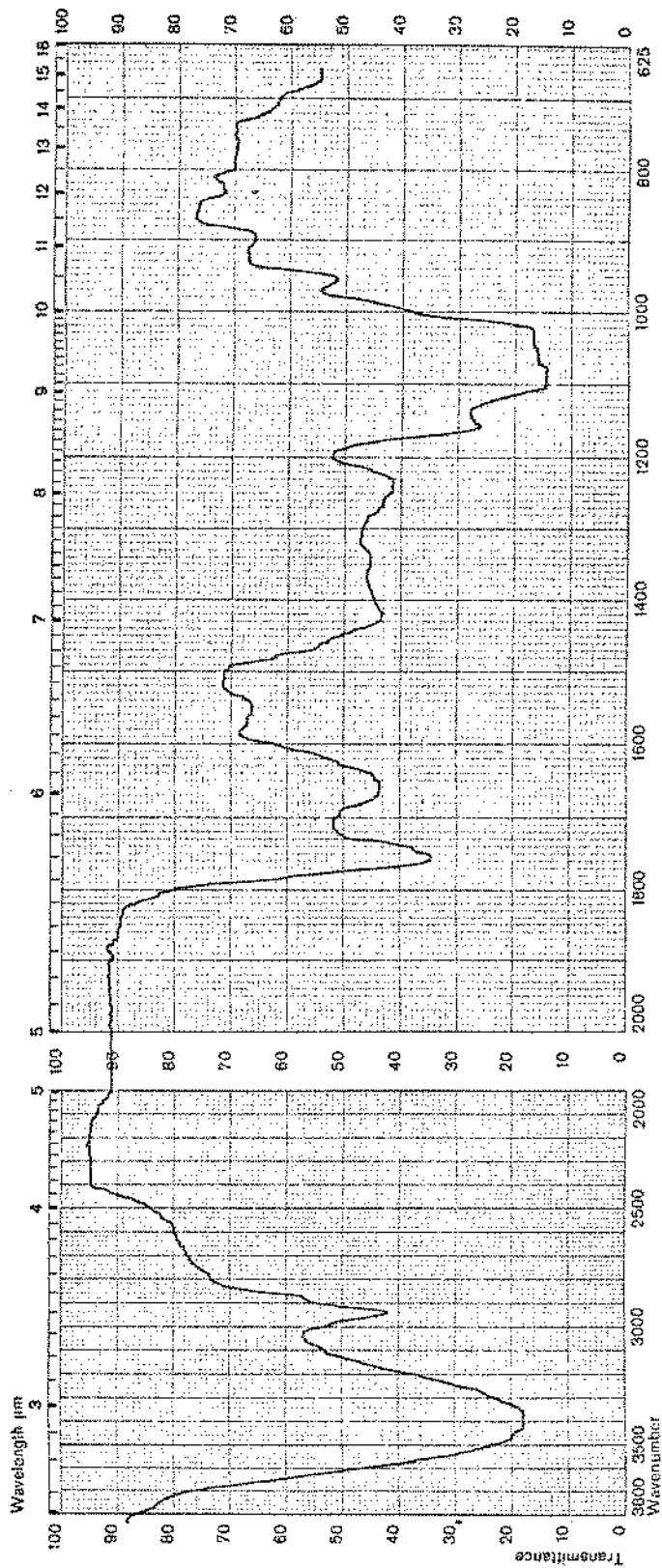
Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10 e o espectro infravermelho do resíduo obtido após as 246 horas de hidrólise encontra-se na Figura 5.

TABELA 10*. Concentrações Relativas dos Monossacarídeos Obtidos Após a Hidrólise Gradativa do Polissacarídeo em Diferentes Intervalos de Tempo e pH e a Temperatura de 70°C.

pH	3,0	2,5	2,0	1,8	1,6	1,6
Tempo (h)	4	20	88	88	20	26
L-arabinose	traços	++++	++++	+++	++	-
D-xilose	-	+	++++	++	+	-
D-galactose	-	-	-	+	++	+++
Ácido D-galacturônico	-	-	-	-	-	-

* O sinal + indica a existência do açúcar e o número de sinais simboliza a quantidade aparente de cada açúcar.

FIGURA 5. Espectro infravermelho do polissacarídeo obtido após 246 horas de hidrólise gradativa (Tabela 10)(KBr).



O resíduo obtido após as 246 horas de hidrólise foi novamente hidrolisado porém com 100 ml de ácido clorídrico 0,1N e a refluxo. Após 2, 4 e 8 horas foram adicionados 300 ml de etanol absoluto e repetido o procedimento acima descrito para as hidrólises sucessivas. As concentrações relativas dos monossacarídeos identificados nos sobrenadantes encontram-se na Tabela 11.

4.3.11. Metilação Exaustiva do Polissacarídeo.

5,0 g do polissacarídeo obtido em 4.3.4 foram adicionados a 45 ml de água destilada e a suspensão foi diluída com 40 ml de hidróxido de sódio 40%. 30 ml de sulfato de metila foram adicionados gota a gota, em atmosfera de nitrogênio, durante um período de três horas com agitação constante a qual foi continuada por mais 15 horas. A mistura de reação foi diluída com 25 ml de água, neutralizada a frio com ácido sulfúrico 25% e concentrada à pressão reduzida até obter uma pasta grossa. O processo foi repetido mais 3 vezes e o produto após concentração foi dialisado por 24 horas após o que o produto foi novamente metilado por duas vezes e de novo dialisado. O produto dialisado foi submetido a mais duas metilações sucessivas usando acetona como solvente e adicionando simultaneamente as soluções de hidróxido de sódio e sulfato de metila, de tal maneira a manter pH alcalino na mistura de reação. O produto obtido foi dialisado durante 48 horas contra água desionizada.

TABELA 11*. Concentrações Relativas dos Monossacarídeos Obtidos Após Hidrólise do Polissacarídeo com Ácido Clorídrico 0,1N e Temperatura de 98°C.

Tempo (h)	2	4	8
D-galactose	+++	+++	+++
Ácido D-galacturônico	+	++	++

* O polissacarídeo utilizado nesta experiência foi aquele obtido após 246 horas de hidrólise gradativa (Tabela 10).

zada e liofilizado. O espectro infravermelho do polissacarídeo metilado está apresentado na Figura 6.

4.3.12. Hidrólise e Identificação dos Produtos de Hidrólise do Polissacarídeo Metilado.

1,0 g do polissacarídeo metilado obtido em 4.3.11 foi hidrolizado primeiramente com ácido fórmico 90% e posteriormente com ácido sulfúrico 0,25M, de acordo com a metodologia descrita por BOUVENG e LINDBERG (44).

Os produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado foram identificados por cromatografia descendente em papel Whatman nº 1. Os solventes utilizados encontram-se na Tabela 12. Os monossacarídeos metilados também foram identificados por cromatografia em camada delgada de sílica gel utilizando-se como solvente benzeno: acetona (1:1 v/v). Tanto na cromatografia em papel quanto na de camada delgada, os cromatogramas foram secos ao ar e revelados com solução de p-anisidina-ácido ftálico. Os valores dos R_f dos açúcares metilados foram determinados e estão reunidos na Tabela 12. Os valores representam a média aritmética dos resultados obtidos em 3 cromatogramas desenvolvidos para cada solvente.

FIGURA 6. Espectro infravermelho do polissacarídeo obtido após metilação exaustiva (Nujol).

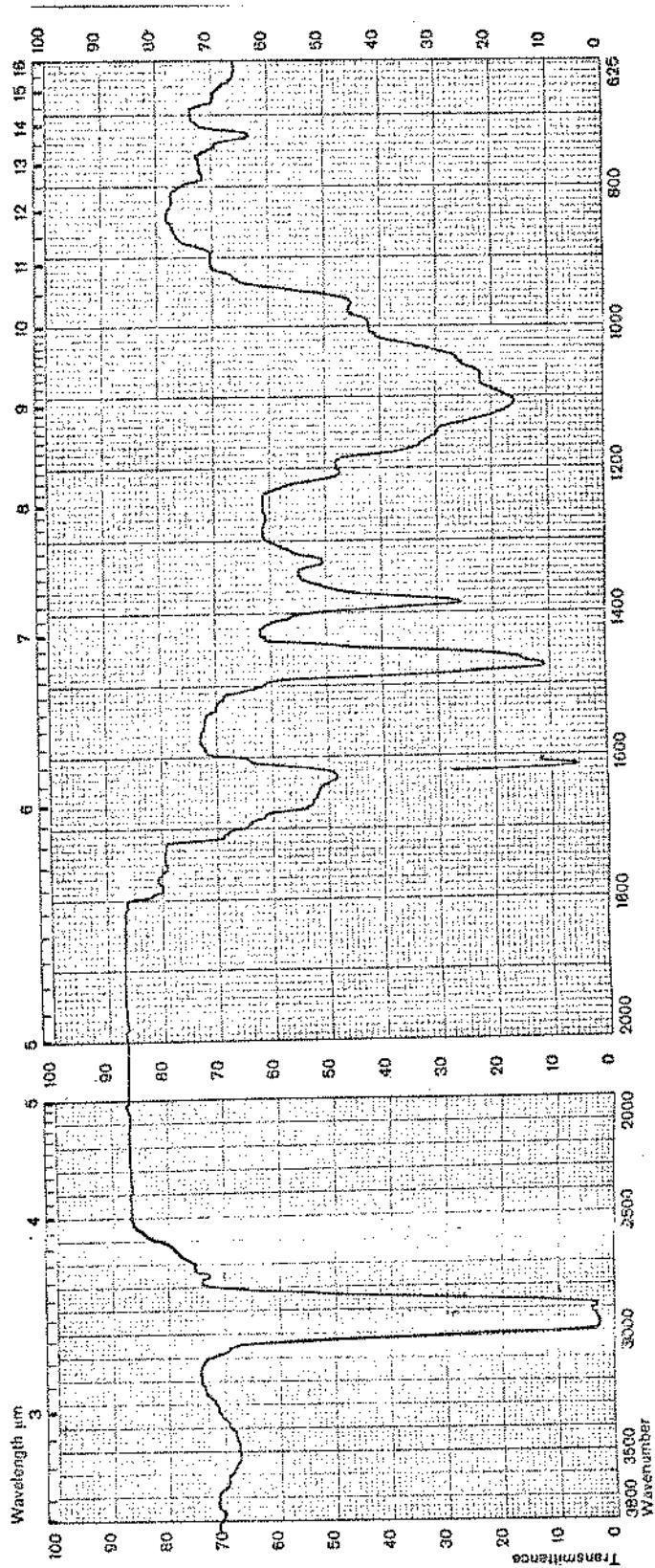


TABELA 12. Solventes Utilizados e Valores de R_g* dos Açúcares Metilados.

TABELA 12. Solventes Utilizados e Valores de R_g* dos Açúcares Metilados.

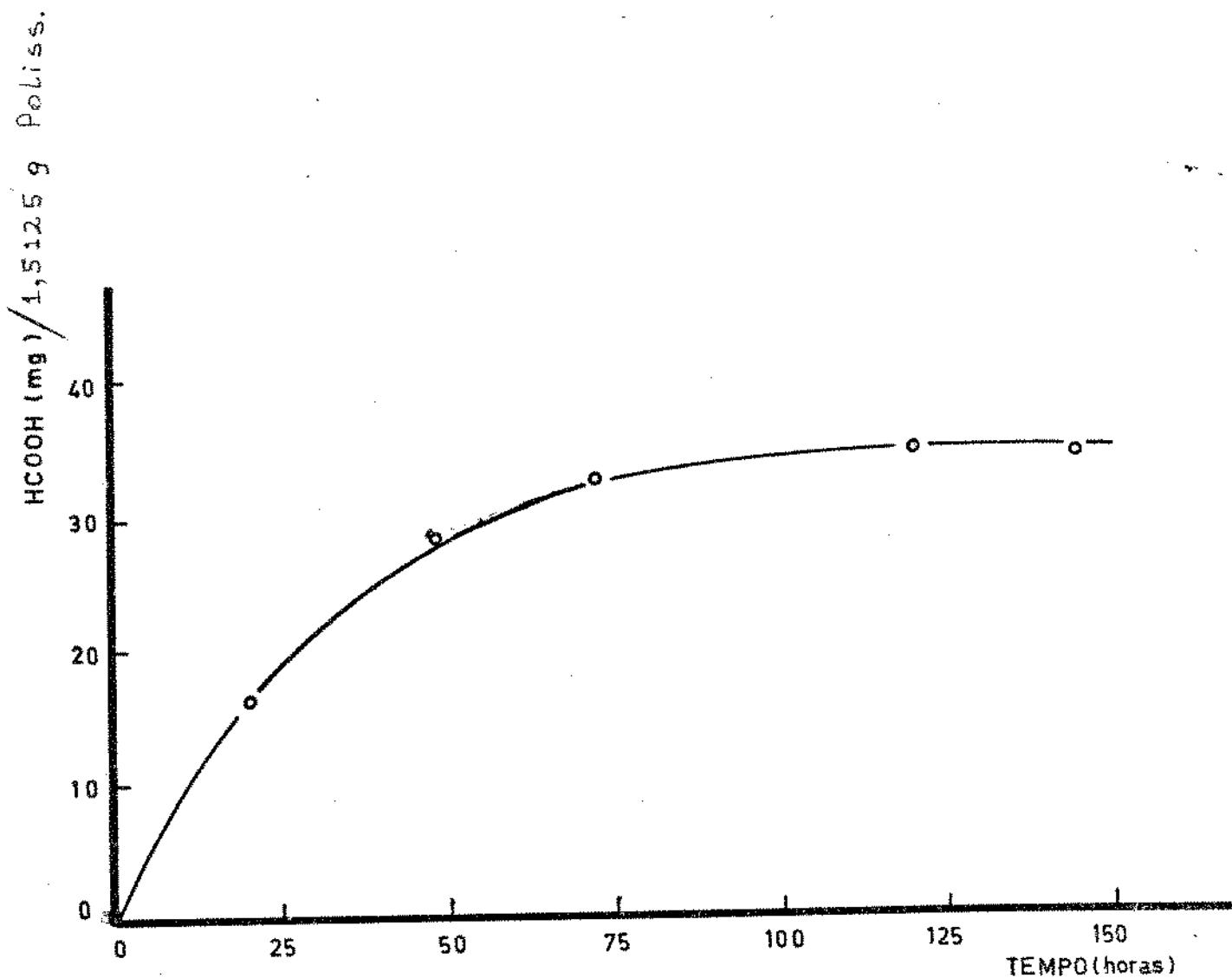
Solventes Utilizados	Cromatografia em Papel						Concentração relativa determinada - visualmente pela coloração produzida pelo revelador p-anisidina-ácido-ftálico.		
	n-Butanol 40 Etanol 10 Amonia 1	n-Butanol 5 Etanol 1 Água 4	n-Butanol 4 Etanol 1 Água 6	R _g Lit. (45)	R _g Lit. (46)	R _g Lit. (47)		CCD de Sílica Gel	
Açúcares Metilados	2,3,5-Tri-O-metil-L-erabiose	95	95	95	95	97	98	-	++++
	2,3,4-Tri-O-metil-D-xilose	94	94	94	94	-	-	111 111	+
	2,3,4,6-Tetra-O-metil-D-galactose	87	88	86	88	89	88	82 81	+
	2,3,Di-O-metil-D-xilose	74	74	75	74	77	-	-	+++
	2,3,6-Tri-O-metil-D-galactose	70	71	72	71	71	71	60 59	+++
		58	-	60	-	63	-	-	++
		50	-	53	-	56	-	-	++
	2,3-Di-O-metil-D-galactose	43	-	42	-	45	46	-	++
	se	37	-	36	-	40	-	-	++

* Valores relativos a 2,3,4,6-Tetra-O-metil-D-glucose (= 100).

4.3.13. Dosagem do Ácido Fôrmico Produzido pela Oxidação do Polissacarídeo com Periodato de Sódio.

Do polissacarídeo obtido em 4.3.4, 1,5125 g foram adicionados a 200 ml de solução de periodato de sódio 0,05M contendo 5,0 g de cloreto de sódio. A solução foi mantida sob agitação constante. Em tempos determinados foram retiradas alíquotas de 10,0 ml e a quantidade de ácido fôrmico produzida determinada por titulação potenciométrica de acordo com o método descrito por HAY, LEWIS e SMITH (48). Os miligramas de ácido fôrmico obtidos em função do tempo de reação encontram-se na Figura 7.

FIGURA 7. Gráfico da Quantidade de Ácido Fôrmico Produzido pela Oxidação do Polissacarídeo com Periodato de Sódio em Função do Tempo de Reação.



4.3.14. Degradação Controlada do Polissacarídeo pela Oxidação com Periodato, Redução e Hidrólise.

Foi preparada uma solução do polissacarídeo em periodato de sódio de maneira idêntica àquela descrita em 4.3.13. A oxidação do polissacarídeo, a redução com boroidreto de sódio e a hidrólise com ácido clorídrico foi feita conforme o método descrito por GOLDSTEIN, HAY, LEWIS e SMITH (49) com as seguintes modificações : (a) na hidrólise a concentração de ácido clorídrico foi 1N, (b) a hidrólise foi efetuada em banho maria à ebulição, durante 5 horas, (c) a análise cromatográfica do hidrolisado foi efetuada por cromatografia-em camada delgada de sílica gel, utilizando como solvente acetona-água (9:1 v/v) e n-butanol-ácido acético-água (2:1:1 v/v) e como reveladores p-anisidina-ácido ftálico e azul de bromofenol. Não foi possível detectar nenhum dos monossacarídeos neutros constituintes do polissacarídeo, porém foi detectado o ácido D-galacturônico.

4.3.15. Determinação do Peso Molecular do Polissacarídeo Utilizando Coluna de SEPHADEX G-100.

Para a determinação do peso molecular do polissacarídeo procedeu-se segundo o método descrito por WHITAKER (50). Para isso foi preparada uma coluna de 31,0 x 1,8 cm contendo 4,5 g (base seca) de Sephadex G-100 fino. Como eluentes foram utilizados tampão acetato - 0,01M, pH 5,0 e tampão Tris 0,1M contendo cloreto de sódio 1M, pH

8,0. A velocidade de fluxo da coluna foi de $3,5 \text{ ml min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Para determinar o volume externo, $V_0=23,0 \text{ ml}$, foi utilizado azul de dextrana-2000 (peso molecular aproximado: 2×10^6). A curva de calibração da coluna foi obtida determinando o volume de eluição, V , de amostras contendo 10 mg de proteínas de peso molecular conhecido. O conteúdo de proteína em cada fração coletada, 1 ml , foi determinado pela leitura direta da absorbância a 280 nm .

As condições e os resultados obtidos na calibração da coluna estão apresentados na Tabela 13, a curva de calibração está apresentada na Figura 8.

De forma semelhante foi determinado o volume de eluição, $V=33,0 \text{ ml}$, de uma amostra, 1 mg , do polissacarídeo obtido em 4.3.4. O conteúdo de polissacarídeo em cada uma das frações coletadas foi determinado pelo método descrito por HODGE e HOFREITER (51), utilizando fenol-ácido sulfúrico e com leitura da absorbância a 480 nm . Os dados obtidos encontram-se na Figura 9.

4.3.16. Determinação da Viscosidade Específica de Soluções do Polissacarídeo.

Utilizando o viscosímetro capilar de CANNON-FENSKE para líquidos opacos foi determinada a viscosidade específica de soluções con

TABELA 13. Peso Molecular das Proteínas Utilizadas e Resultados Obtidos na Calibração da Coluna de SEPHADEX G-100 Fino.

Proteína	pH	Peso Molecular	Log. P.M.	Vol. Eluição V (ml)	V/Vo
Mioglobina	8,0	16,900	4,228	56,75	2,47
α -quimotripsina	5,0	22,500	4,352	53,0	2,30
Tripsina	5,0	23,800	4,377	50,25	2,18
Pepsina	8,0	35,500	4,550	42,0	1,83
Pepsina	5,0	35,500	4,550	42,0	1,83
Albumina	8,0	70,000	4,845	34,5	1,50

FIGURA 8. Gráfico da Relação entre Volume de Eluição (V/Vo) e Peso Molecular de Proteínas na Coluna de Sephadex - G-100 Fino a Temperatura de 26±1°C.

- | | |
|----------------------|-------------|
| 1. Mioglobina | 4. Pepsina |
| 2. α - Quimotripsina | 5. Albumina |
| 3. Tripsina | |

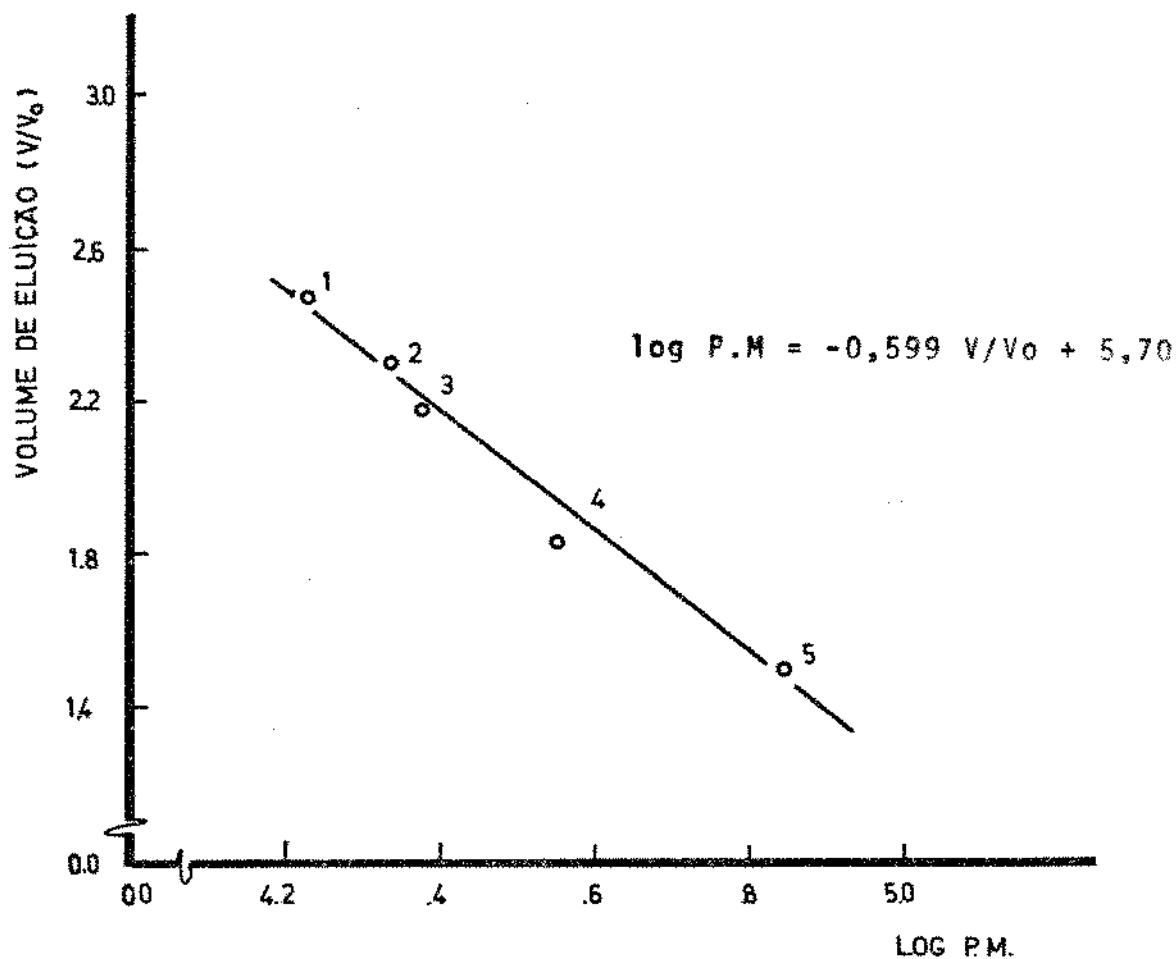
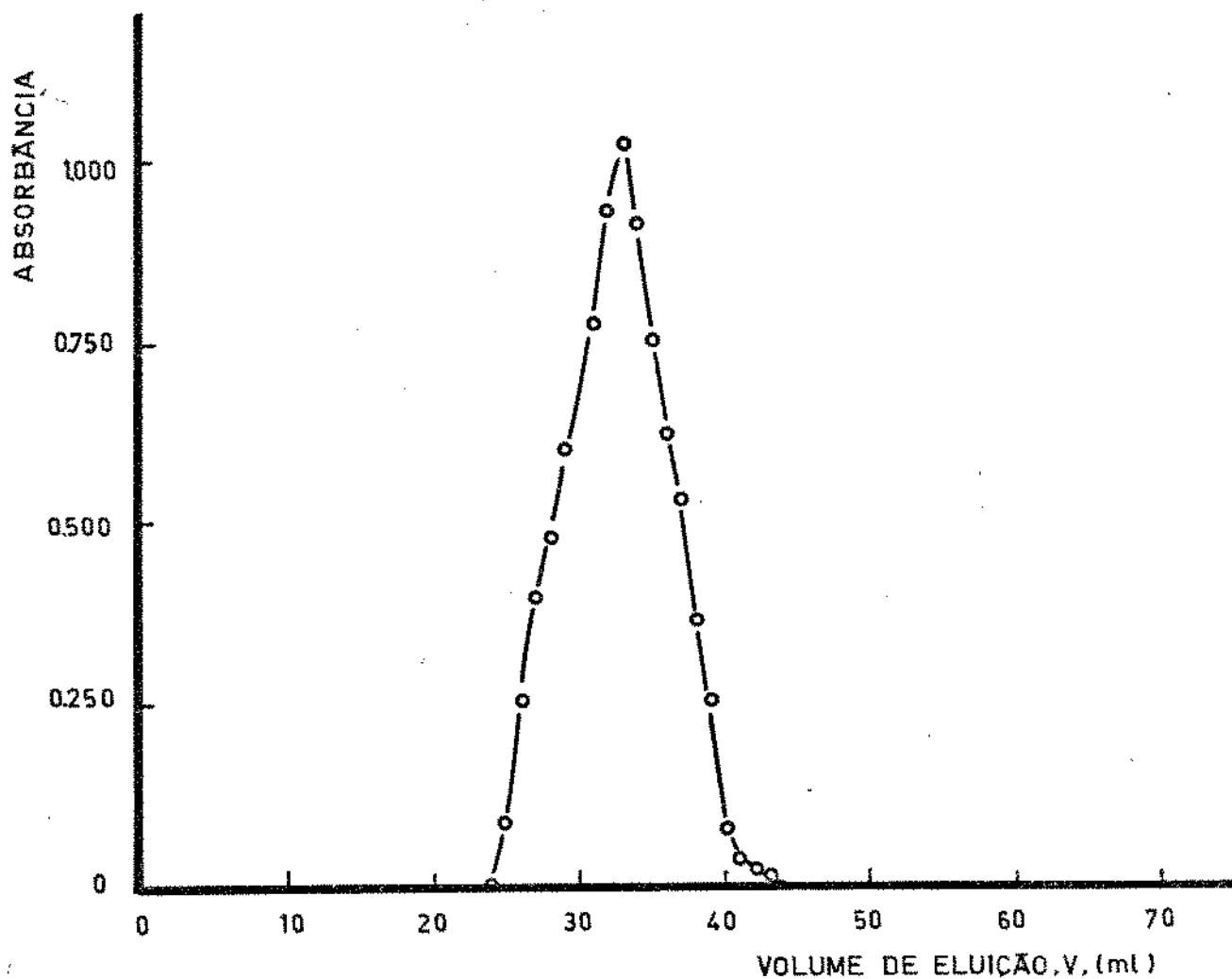


FIGURA 9. Gráfico Representativo da Eluição do Polissacarídeo da Palma Gigante em Sephadex G-100 Fino.



tendo as seguintes concentrações do polissacarídeo obtido em
4.3.4: 0,0125; 0,025 e 0,05% nos seguintes solventes:

1. Água destilada;
2. Solução 5% de cloreto de sódio em água destilada;
3. Água destilada com pH 3,0 ajustado com ácido clorídrico;
4. Solução aquosa de sacarose a 5,0%.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 10.

Também foi determinada a viscosidade específica de soluções contendo 0,05% do polissacarídeo obtido em 4.3.4 e 0,01; 0,05 e 0,1% de cloreto de sódio. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11.

FIGURA 10. Gráficos das Viscosidades Específicas em Função de Várias Concentrações do Polissacarídeo da Palma Gigante em Diferentes Soluções: 1. Solução Aquosa . 2. Solução Aquosa contendo 5,0% de Sacarose. 3. Solução Aquosa com pH Ajustado a 3,0 e 4. Solução Aquosa contendo 5,0% de Cloreto de Sódio.

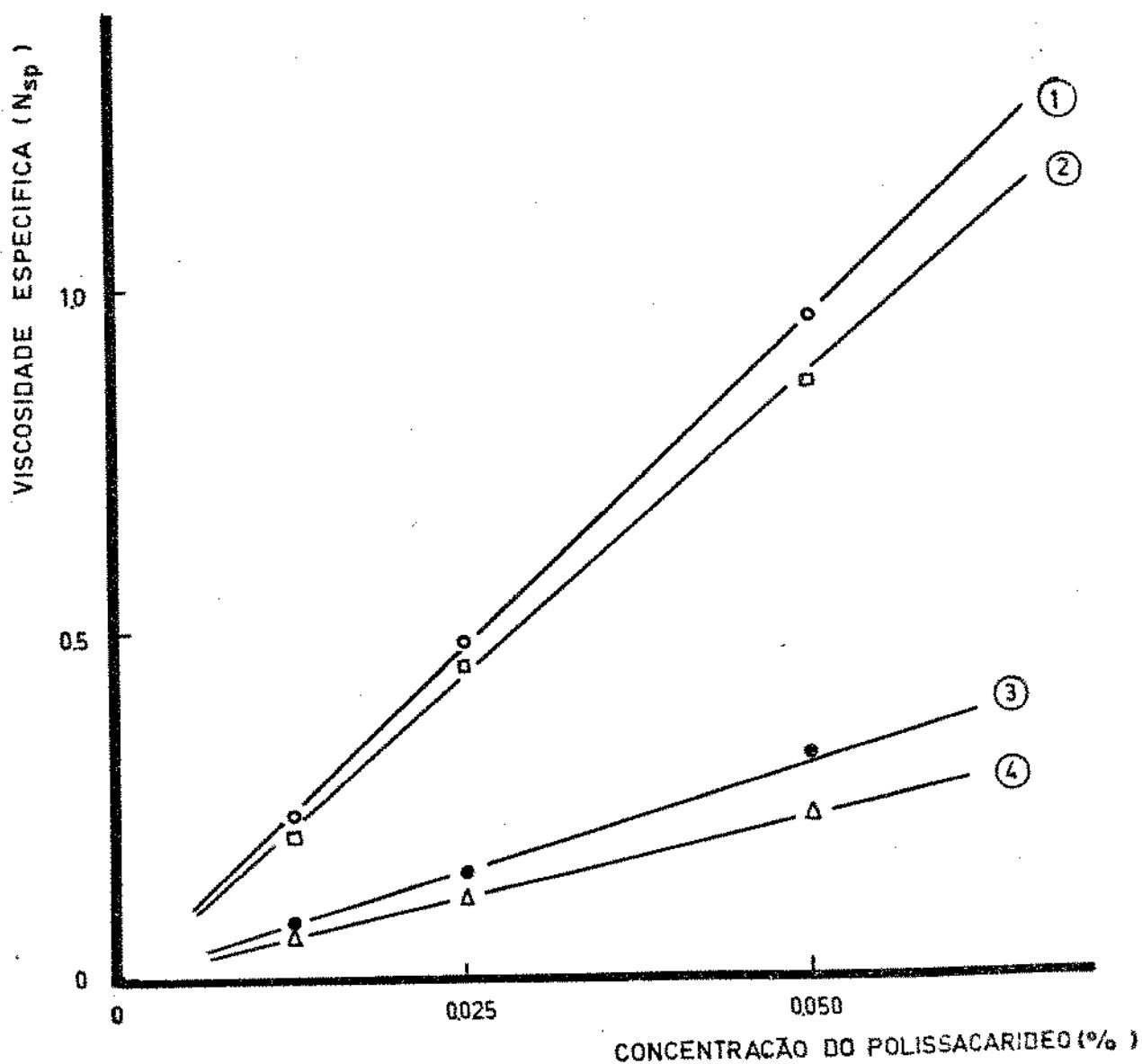
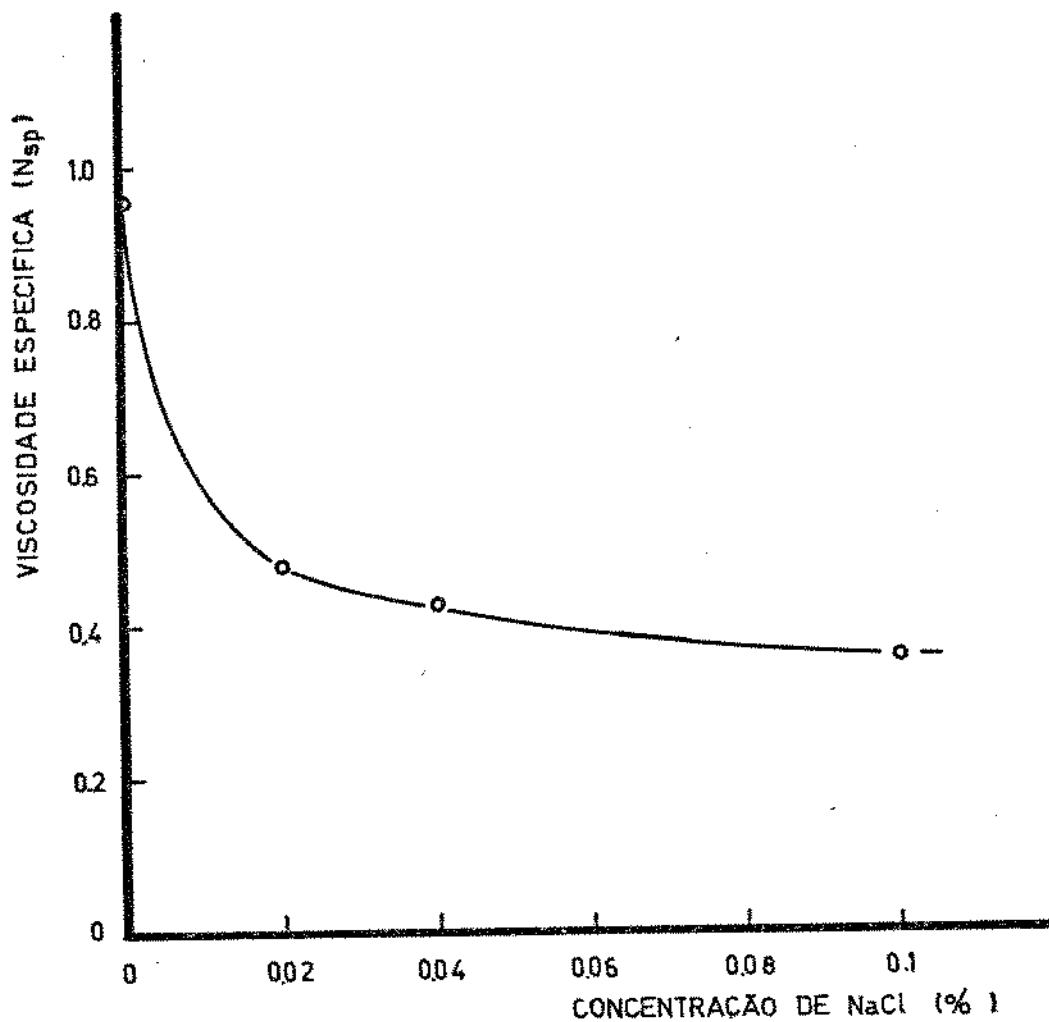


FIGURA 11. Gráfico do Efeito da Concentração de Cloreto de Sódio na Viscosidade Específica de Soluções Aquosas contendo 0,05% do Polissacarídeo da Palma Gigante.



5. DISCUSSÃO

5.1. Métodos Analíticos

Todos os métodos analíticos usados neste trabalho foram métodos padronizados e têm sido empregados rotineiramente por diversos autores de modo que é possível comparar os resultados deste trabalho com os resultados de trabalhos semelhantes já publicados. A matéria prima utilizada neste trabalho foi caracterizada na sua composição e características físicas externas conforme os resultados apresentados na Tabela 5, mostrando-se semelhante ao material descrito por CAMPELLO e CORREA (6).

5.2. Extração e Purificação do Polissacarídeo

As "raquetes" da palma foram escaldadas com vapor de água - para amolecer o tecido e para inativar o complexo enzimático da planta. A inativação visou evitar possíveis degradações enzimáticas dos carboidratos. Considerando que as peroxidases são as enzimas mais estáveis ao calor, a inativação enzimática foi considerada satisfatória quando o material tratado não mais mostrou atividade enzimática de peroxidases. Por razões análogas a purificação do polissacarídeo foi feita de modo a evitar os efeitos de ácidos ou bases que poderiam causar degradação ou hidrólise -

das moléculas, especialmente quando existem estruturas furanosídicas ou ácidos urônicos como parte da molécula do polissacarídeo. Deste modo foi escolhido o método de SEVAG (35) para a desproteção do produto ainda que seja um método trabalhoso e mais indicado para pequenas quantidades.

A homogeneidade do polissacarídeo purificado foi estabelecida por eletroforese em papel. Considerando que a mobilidade dos açúcares na eletroforese é função do seu peso molecular e da sua carga, a obtenção de uma única mancha na eletroforese em papel do polissacarídeo (4.3.5) indicou que o produto era homogêneo. Método semelhante tem sido utilizado por outros autores (BROWN et al (2); JONES e PERRY (52), SRIVASTAVA e PAUDE (15)) para verificar a homogeneidade de polissacarídeos.

A homogeneidade do polissacarídeo foi confirmada em coluna de SEPHADEX G-100 desde que uma única banda de eluição foi obtida, (Figura 9).

O espectro infravermelho do polissacarídeo purificado (Figura 4) mostrou bandas de absorção características dos seguintes grupos funcionais: hidroxila e carboxila.

5.3. Identificação e Dosagem dos Monossacarídeos Constituintes do Polissacarídeo.

A hidrólise total do polissacarídeo (4.3.6) permitiu identificar por cromatografia em papel e pelas osazonas preparadas os seguintes açúcares: D-xilose, L-arabinose e D-galactose. O ácido urônico cuja existência havia sido prevista no polissacarídeo pela presença das bandas de absorção na região de 1650 e 1730 cm^{-1} do espectro infravermelho (Figura 4) e pelo resultado do teste com Carbazol-ácido sulfúrico (28) foi identificado nos produtos de hidrólise, por cromatografia em camada delgada, como sendo ácido galacturônico, o que foi confirmado pela formação e identificação de ácido D-galactárico por oxidação do produto com bromo em água.

A composição qualitativa do polissacarídeo isolado da palma mostrou ser diferente daquela atribuída ao polissacarídeo isolado de *Opuntia ficus indica* por AMIN e colaboradores (12) que encontraram ramnose mas não ácido galacturônico em seu produto. Outros polissacarídeos isolados de *Opuntias* (1,2 e 10) contêm ramnose, exceção de *Opuntia dillenii* cujo polissacarídeo só contém D-galactose e L-arabinose (15).

A determinação quantitativa dos componentes do polissacarídeo obtido (4.3.8) mostrou resultados semelhantes àqueles obtidos por AMIN e colaboradores (12) para os açúcares neutros da *Opuntia ficus indica*.

5.4. Hidrólise Gradativa do Polissacarídeo.

As determinações preliminares executadas no polissacarídeo- (hidrólise total, dosagem dos produtos de hidrólise, espectro infravermelho) forneceram apenas conhecimentos relativos à composição qualitativa e quantitativa em monossacarídeos na molécula do polissacarídeo, tais dados entretanto não foram suficientes para a reconstrução da estrutura da cadeia do composto pois os dados-obtidos não esclareciam a maneira como os monossacarídeos se ligam entre si.

A hidrólise gradativa forneceu alguma informação a respeito da estrutura do polissacarídeo pela hidrólise preferencial nos resíduos dos açúcares mais susceptíveis à ação de ácidos. Furanosídeos são hidrolizados mais rapidamente do que piranosídeos e isso parece ser devido à conformação quase plana do anel de 5 membros nos furanosídeos o que deverá resultar num estado de transição menos deformado (53). Também, os pentapiranosídeos são hidrolizados mais rapidamente do que hexapiranosídeos tendo sido mostrado por Be MILLER (53) que há uma relação direta entre a velocidade de hidrólise e a facilidade de rotação dos carbonos das ligações C4 e C5, e assim a remoção de um grupo volumoso como o grupo $-CH_2OH$ do C5 deverá facilitar a hidrólise dos pentapiranosídeos.

Na hidrólise de polissacarídeos a ligação glicosídica do final de cadeia é hidrolisada mais rapidamente do que as outras ligações. Esta conclusão provém do fato de que a hidrólise de uma ligação glicosídica interna do polissacarídeo através da formação do íon carbonio-oxônio necessitará a reorientação de um grupo volumoso ao contrário do que ocorreria na hidrólise de grupos terminais (53).

Pelos dados apresentados na Tabela 10 verificamos que o primeiro açúcar a ser hidrolisado foi a L-arabinose. As condições brandas em que foi feita a hidrólise (4.3.10) indicam que a L-arabinose deveria estar na forma furanosídica além de possivelmente ser unidade terminal na molécula do polissacarídeo. A porcentagem de L-arabinose encontrada para o polissacarídeo (4.3.8) sugere, por outro lado, que esta pentose deverá estar ligada lateralmente.

O aparecimento da D-xilose como único outro componente ao lado da L-arabinose após 24 e 112 horas de hidrólise indica que a D-xilose estaria na forma piranosídica, o que justificaria a sua menor velocidade de hidrólise. O não aparecimento de outros açúcares mesmo após 112 horas de hidrólise (Tabela 10) pode ser considerado - evidência da ligação lateral da D-xilose.

O fato da β -galactose ser o monossacarídeo encontrado em maior -

proporção no polissacarídeo (4.3.8) e de ser o único açúcar produzido entre 220 e 246 horas de hidrólise (Tabela 10) sugere a possibilidade deste açúcar formar a cadeia principal da molécula do polissacarídeo. Pelos dados da Tabela 11 verificamos que somente o ácido D-galacturônico foi produzido conjuntamente com a D-galactose; isto nos sugere a possibilidade do ácido D-galacturônico estar ligado diretamente na cadeia de unidades de D-galactose.

O resíduo do polissacarídeo não hidrolisado após 246 horas de hidrólise (4.3.10) forneceu o espectro infravermelho apresentado na Figura 5. As bandas de absorção na região de 1660 e 1750 cm^{-1} indicam a existência de grupos -COOH neste material que após nova hidrólise (4.3.10) forneceu além de galactose um outro açúcar identificado como ácido D-galacturônico (Tabela 11).

5.5. Metilação, Hidrólise e Identificação dos Produtos de Hidrólise do Polissacarídeo.

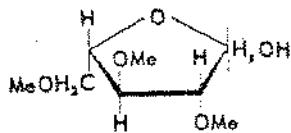
A metilação exaustiva de polissacarídeos com posterior identificação dos produtos de hidrólise do composto metilado é útil na elucidação da estrutura de polissacarídeos já que permite estabelecer como as unidades de monossacarídeos estão ligadas entre si e quais as unidades terminais e as unidades nas quais ocor

rem as ramificações.

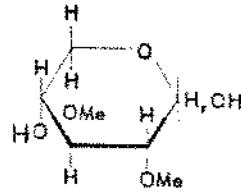
A separação e identificação dos produtos de hidrólise de polissacarídeos metilados pode ser feita por cromatografia em papel. Este procedimento foi utilizado entre outros por HIRST, HOUGH e JONES (45) na separação e identificação dos produtos de hidrólise de vários polissacarídeos metilados.

A metilação total da molécula do polissacarídeo pode oferecer dificuldades e mesmo na metilação exaustiva existem sempre boas possibilidades de grupos -OH residuais. A verificação do alcance da metilação pelo espectro infravermelho, Figura 6, mostrou que o produto obtido na metilação praticamente estava livre de grupos -OH.

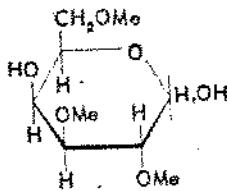
Pelos dados apresentados na Tabela 12 verificamos que os açúcares produzidos em maior proporção pela hidrólise do polissacarídeo metilado e cujas estruturas estão apresentadas na Figura 12 foram: 2,3,5-tri-O-metil-L-arabinose; 2,3,6-tri-O-metil-D-galactose e 2,3-di-O-metil-D-xilose.



2,3,5-tri-O-metil-L-arabinose



2,3-di-O-metil-D-xilose



2,3,6-tri-O-metil-D-galactose

FIGURA 12. Açúcares Identificados no Hidrolisado do Polissacarídeo Metilado.

A identificação do 2,3,5-tri-O-metil-L-arabinose como único produto derivado da L-arabinose indicou que este açúcar se encontrava na molécula do polissacarídeo na forma furanosídica e que o mesmo poderia estar unicamente como unidade terminal. Os dados obtidos confirmam a estrutura proposta com base nos dados da hidrólise gradativa (4.3.10). O mesmo produto foi identificado por BROWN et al (2), por AMIN e colaboradores (12) e por MINDT et al (17) em mucilagens obtidas de cactus *Opuntia*. A identificação de 2,3,4-tri-O-metil-D-xilose como um dos produtos derivados da D-xilose (4.3.12) sugeriu a possibilidade da D-xilose se encontrar na forma de anel piranosídico e a baixa proporção daquele derivado nos produtos de hidrólise (4.3.8) indicou que o mesmo é proveniente de unidades terminais de D-xilose. A presença de 2,3,4-tri-O-metil-D-xilose foi também verificada por BROWN et al (2) e por MINDT e colaboradores (17) em mucilagens obtidas de cactus *Opuntia*.

A identificação de 2,3-di-O-metil-D-xilose em proporção elevada nos produtos de hidrólise (4.3.12) mostrou a possibilidade da existência de cadeias de unidades de D-xilopiranosose ligadas entre si através de ligações glicosídicas 1+4. Os dados obtidos estão de acordo com os resultados da hidrólise gradativa (4.3.10).

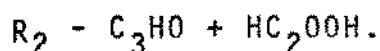
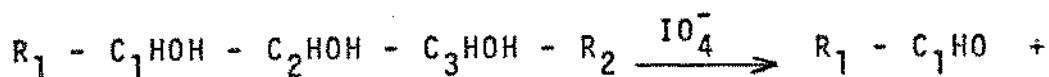
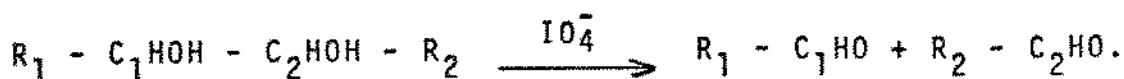
A identificação de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose (4.3.12) su

geriu que a D-galactose se encontraria no polissacarídeo na estrutura piranosídica e a baixa proporção daquele derivado nos produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado indicaria que o mesmo era proveniente de unidades terminais de D-galactose. A presença de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose também foi verificada por MINDT et al (17) em cactus *Opuntia*. A presença de uma alta proporção de 2,3,6-tri-O-metil-D-galactose nos produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado sugeriu que na formação da cadeia as unidades de D-galactose estariam ligadas entre si através de ligações glicosídicas 1+4. A presença de 2,3,6-tri-O-metil-D-galactose foi também verificada por AMIN et al (12) na mucilagem extraída de *Opuntia ficus indica*. A presença de 2,3-di-O-metil-D-galactose foi indicativa de que a cadeia de unidades de D-galactose possuiria substituintes através do grupo hidroxila do carbono 6.

5.6. Oxidação do Polissacarídeo com Periodato.

A análise de carboidratos por oxidação com ácido periódico, técnica descrita por MALAPRADE já em 1928 (54), permite pela oxidação de glicóis vicinais verificar a presença de tais grupos ou de substituintes nas hidroxilas dos açúcares. Aldeídos são produzidos a partir de α , β -glicóis e ácido fórmico é produzido durante a oxidação de α , β , γ glicóis de acordo com o esquema abai-

xo:



O andamento da reação de oxidação com periodato pode ser seguido pela determinação da quantidade de ácido fórmico produzido durante o processo (48).

A análise da Figura 7 mostra que a quantidade de ácido fórmico produzido foi baixa (2,3%) ou seja havia poucos grupos -CHOH - CHOH - CHOH - na molécula do polissacarídeo. Tais dados reforçam a possibilidade da estrutura furanosídica da L-arabinose terminal e também confirmam a possibilidade evidenciada pelos produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado de que a D-xilose estaria formando cadeias laterais e que a D-galactose forma cadeias através de ligações glicosídicas 1+4.

O fato de não ter sido detectado nenhum dos açúcares neutros após a oxidação, redução e hidrólise do polissacarídeo (4.3.14) indicou que cada um dos monossacarídeos deve possuir dois grupos hi

droxilas vicinais livres. Tal afirmação também está de acordo - com a análise dos produtos da metilação (4.3.12), já que a L-arabinofuranose terminal, as unidades de D-xilopiranosose terminais e as ligadas entre si através de ligação glicosídica 1+4 e a D-galactopiranosose substituída nos C-1, C-4 e C-6 possuem - grupos -CHOH-CHOH- livres. O fato de ter sido detectado ácido D-galacturônico nos produtos de oxidação, indicou que as moléculas de ácido D-galacturônico presentes no polissacarídeo, não possuem grupos -CHOH-CHOH- livres. BROWN et al (2) verificaram que o ácido D-galacturônico presente no polissacarídeo da *Opuntia fulgida* possui substituintes nos C-1, C-3 e C-4.

5.7. Viscosidade de Soluções do Polissacarídeo.

Pela análise da Figura 10 verifica-se que a viscosidade das soluções diluídas do polissacarídeo diminui pelo abaixamento do pH. Essa mudança de viscosidade corrobora os dados que indicaram a presença de ácido urônico na molécula do polissacarídeo já que uma das características de polissacarídeos contendo grupos carboxilas é exatamente a alteração da viscosidade de suas soluções - com a mudança do pH. Esse tipo de comportamento foi verificado - nas soluções de pectina (55 e 56) e de goma arábica (57).

A explicação desse tipo de comportamento reológico foi tentada

por OWENS et al (56) que admitiram um dos seguintes fatores como atuando nesse fenômeno: (a) interação entre soluto e solvente, (b) esticamento ou encolhimento da molécula (c) aumento da quantidade de trabalho necessário para mover os ions um em relação ao outro.

Pela Figura 10 verifica-se também que a adição de sacarose teve um efeito menos pronunciado sobre a viscosidade do que a variação do pH. A alteração provocada pela adição de sacarose poderia ser atribuída à diminuição da atividade da água e conseqüente efeito sobre a hidratação da molécula do polissacarídeo. Efeito semelhante foi preconizado por CARLSON e ZIEGENFUSS (58) no caso de goma guar.

A adição de cloreto de sódio mostrou considerável efeito na viscosidade de soluções do polissacarídeo (Figura 10). A diminuição da viscosidade foi também estudada mais detalhadamente pela verificação do efeito de concentrações crescentes de cloreto de sódio sobre soluções do polissacarídeo (Figura 11). O exame do gráfico mostra que há uma concentração limite de cloreto de sódio - acima da qual o efeito é praticamente constante. Resultado semelhante foi observado por OWENS et al (56) e por KORTSCHAK (59) em soluções diluídas de pectina.

5.8. Estrutura Proposta para a "unidade básica" do Polissacarídeo.

Com base nos dados experimentais obtidos, uma das possíveis estruturas para a "unidade básica" do polissacarídeo é apresentada na Figura 13.

Pelos dados obtidos na dosagem dos produtos de hidrólise (4.3.8) verificamos que os monossacarídeos constituintes do polissacarídeo encontram-se na seguinte relação molar: 1:3:3:1 respectivamente para D-xilose, L-arabinose, D-galactose e ácido D-galacturônico, resultado esse que é compatível com a estrutura proposta.

Considerando que o peso molecular do polissacarídeo é aproximadamente $6,9 \times 10^4$ (4.3.15) a molécula do mesmo teria 27 unidades por molécula, o que está de acordo com o resultado da dosagem do ácido fórmico produzido pela oxidação do polissacarídeo com periodato (calculado: 2,8%, encontrado: 2,3%).

A estrutura proposta é compatível com os produtos da hidrólise do polissacarídeo permetilado (Tabela 12). Também a identificação de, unicamente, ácido D-galacturônico após oxidação, redução e hidrólise (4.3.14) corrobora a estrutura proposta a qual também está de acordo com os resultados da hidrólise gradativa (4.3.10). Deve ser esclarecido que a estrutura proposta é apenas uma das estruturas possíveis da molécula do polissacarídeo.

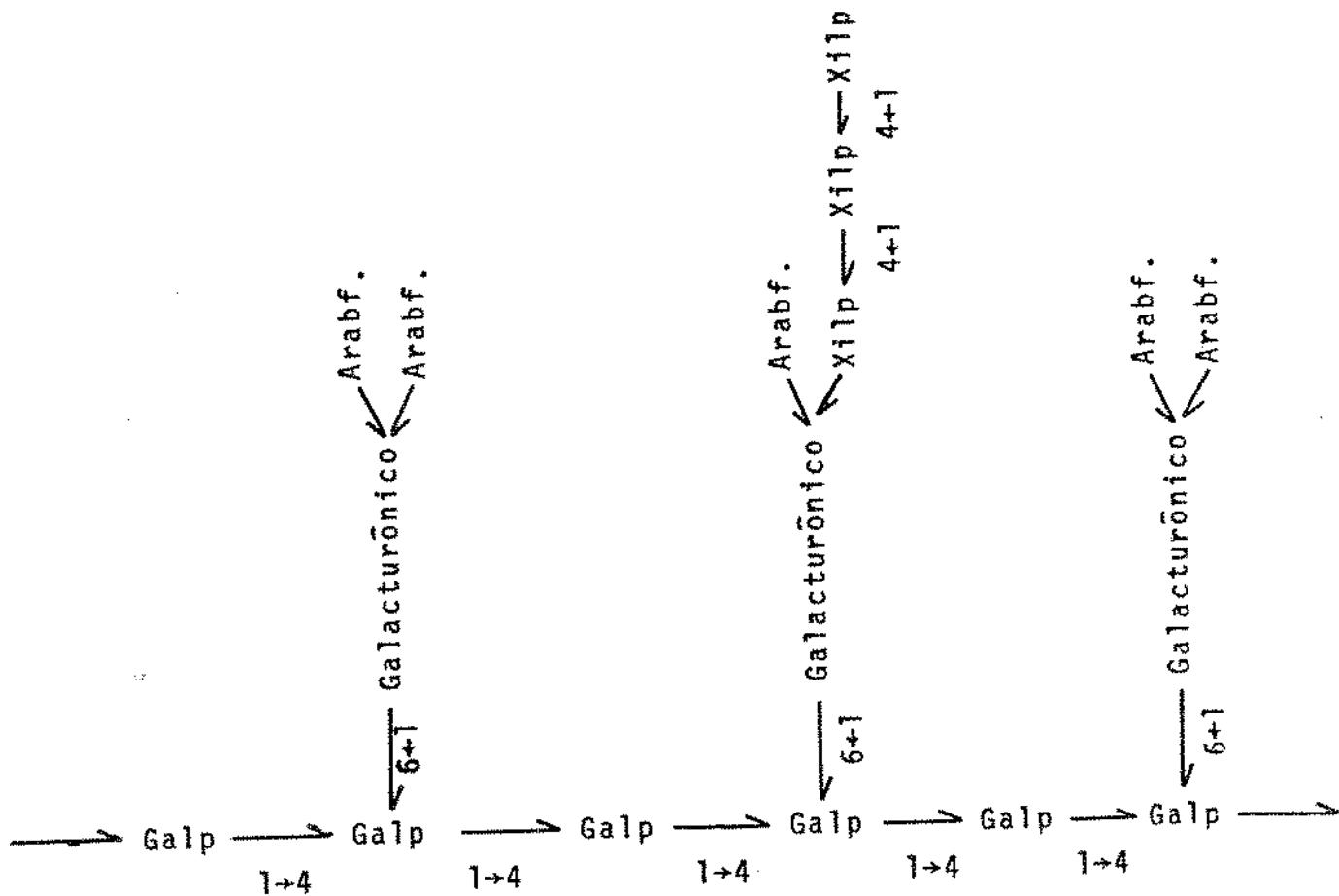


FIGURA 13. Estrutura Proposta Para a "Unidade Básica" da Molécula do Polissacarídeo.

Galp = D-galactopiranosil
 Arabf = L-arabinofuranosil
 Xilp = D-xilopiranosil

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos conclue-se que:

1. Glicose, frutose e sacarose foram os açúcares solúveis encontrados nas "raquetes" da palma gigante (*Opuntia ficus indica*, Mill).
2. O polissacarídeo isolado das "raquetes" da palma contém: D-xilose, L-arabinose, D-galactose e ácido D-galacturônico.
3. No polissacarídeo a D-galactose é o componente da cadeia principal, a D-xilose e a L-arabinose estão ligadas lateralmente à cadeia principal enquanto que o ácido D-galacturônico deve estar ligado direta e lateralmente à cadeia principal do polissacarídeo.
4. A L-arabinose encontra-se no polissacarídeo na conformação furanosídica e unicamente como unidade terminal e a D-xilose encontra-se na conformação piranosídica e forma cadeias laterais através de ligações glicosídicas 1→4, enquanto que a D-galactose encontra-se na conformação piranosídica e

está ligada entre si através de ligações glicosídicas 1→4 com ramificações nos grupos hidroxilas do carbono 6.

5. Os açúcares neutros constituintes do polissacarídeo possuem dois grupos hidroxilas vicinais livres na sua molécula e o ácido D-galacturônico não possui dois grupos hidroxilas vicinais livres na sua molécula.
6. A viscosidade de soluções aquosas do polissacarídeo diminui pelo abaixamento do pH e pela adição de sacarose, ou de cloreto de sódio.

RESUMO

Da mucilagem de "raquetes" da palma gigante (*Opuntia ficus indica*, Mill.) foi obtido por extração aquosa um polissacarídeo. O produto purificado e eletroforeticamente homogêneo foi submetido a reações de hidrólise, metilação e oxidação com periodato de sódio para o estudo da sua estrutura. O peso molecular do polissacarídeo foi estimado por filtração em gel de Sephadex. Foi também estudada a viscosidade de soluções aquosas do polissacarídeo e o efeito de sacarose, cloreto de sódio e do pH sobre a viscosidade.

Com base nos resultados obtidos foi proposta uma estrutura possível para a "unidade básica" do polissacarídeo.

SUMMARY

Aqueous extraction of the mucilage obtained from "palma gigante" (*Opuntia ficus indica*, Mill) yielded a polysaccharide which was purified to an electrophoretically homogeneous fraction. The purified polysaccharide was hydrolysed, exhaustively methylated and oxidized with sodium periodate. The molecular weight of the polysaccharide was determined by gel filtration on sephadex.

Measurements were made of the viscosity of aqueous solutions of the polysaccharide and of the effect of sucrose, sodium chloride and different pH on their viscosities.

A possible structure for the basic unit of the polysaccharide was suggested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SANDS, L. & KLAAS, R.—The composition of cholla gum. I. The isolation of L-arabinose, D-galactose and L-rhamnose. J. Am. Chem. Soc. 51: 3441, (1929).
2. BROWN, F., HIRST, E.L. & JONES, J.K.N.—Cholla gum (*Opuntia fulgida*). J. Chem. Soc. 1761, (1949).
3. FERNANDEZ, A.C.—Industrial utilization of *Opuntia ficus indica*. 10th Congr. Intern. Ind. Agr. y Aliment. Madrid, 1078, (1954)(c.f. Chem. Abs. 50: 15000f, (1956)).
4. ALDERETE, A.—The absorptive properties of the fleshy pulp of some species of *Opuntia* and *Cereus*. Publs. Inst. Invest. Microquim. Universidade Nacional Litoral. (Rosário, Argentina) 21: 69, (1955).
5. MELLA, M.A.R.—Estudio Bromatológico de Tunas (*Opuntia ficus indica*) y Peras (*Pyrus communis*). Anales Fac. Quím. Farm. Univ. Chile 10: 94, (1958).
6. CAMPELLO, B.E. & CORRÊA, A.S.—Emprego das cactáceas forra-

geiras no polígono das sêcas. Serv. Inf. Agric. nº 845, Minist. Agric. Rio de Janeiro, (1960). p. 1-34.

7. CORRÊA, A.S.—Revisão dos conhecimentos sobre as "Palmas Forrageiras". Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco. Boletim nº 5, (1963) p. 1-41.
8. VILLAREAL, F., MENDOZA, P.R., ARELLANO, V. & MORENO, J.—Estudio químico sobre seis espécies de nopales (*Opuntia spp.*). Ciencia (Mex.) 22: 59 (1963).
9. VILLAREAL, F., ALVA, B.E. & ROMERO, G.—Estudio químico sobre jugos de tunas enlatadas. Ciencia (Mex.) 23(2): 75, (1964).
10. PARIKH, V.M. & JONES, J.K.N.—Cholla gum. I. Structure of the degraded cholla gum. Can. J. Chem. 44: 327, (1966).
11. _____ & _____.—Cholla gum. II. Structure of the undegraded cholla gum. Can. J. Chem. 44: 1531, (1966).
12. AMIN, E.S., AWAD, O.M. & ELSAYED, M.M.—Mucilage of *Opuntia ficus indica*. Carbohyd. Res. 15(1): 159, (1970).

13. OSPINA, C.M.E.—Contribución al estudio de *Opuntia ospinae* (*cactaceae*). Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 1(4): 71, (1971).

14. ESPINOSA, A.J., BORROCAL, A.R., JARA, M., ZORRILLA, G.C., ZANABRIA, P.C. & MEDINAT, J.—Properties and preliminary investigations on the preservation of the fruits and juice of the Barbary fig (*Opuntia ficus indica*). Fruits 28(4): 285, (1973). (c.f. Chem. Abs. 79: 77168 Z, (1973)).

15. SRIVASTAVA, B.K. & PAUDE, C.S.—Arabinogalactan from the pods of *Opuntia dillenii*. Planta Med. 25(1): 92,(1974).

16. GARCIA, P.A.G., SOLER, A. & BARBA, F.—Estudio del disacárido isomaltosa (*Opuntiosa*). Anales de Química (España) 71(4): 386,(1975).

17. MINDT, L., SAAG, K., SANDERSON, G.R., MOYNA, P. & RAMOS, G. Cactaceae mucilage composition. J.Sci. Food. Agric. 26(7): 993,(1975)

18. LERCKER, G., LERICI, C.R. & CAPELLA, P.—Caratteri chimici del fico d'India (cactus *Opuntia*). Carboidrati e lipidi del frutto. Riv. Ital. Sostanze Grasse 53(10): 250. (1976).

19. WALKER, H.G.Jr., MILDRED, G. & McCREADY, R.M.—Complete methylation of reducing carbohydrates. *J. Org. Chem.* 27, 2100, (1962).
20. IRVINE, J.C. & OLDHAM, J.W.H.—The constitution of polysaccharides part III. The relationship of 1- - glucosan to D-glucose and to cellulose. *J. Chem. Soc.* 119, 1744, (1921).
21. HAY, G.W., LEWIS, B.A. & SMITH, F.—Thin - film chromatography in the study of carbohydrates. *J. Chromatog.* 11, 479, (1963).
22. LEWIS, B.A. & SMITH, B.A.—Sugars and Derivatives. In: STAHL, E., ed.—Thin - layer chromatography. 2nd ed. New York, Springer - Verlag, (1969), p.(a) 820 e (b) 829.
23. _____, SMITH, F. & STEPHEN, A.M.—Galactaric acid and its derivatives. In: WHISTLER, R.L. & WOLFRON, M.L. ed. - *Methods in carbohydrate chemistry*. New York, Academic Press, (1963), v.2, p.38-46.
24. SHRINER, R.L. & FUSON, R.C. — *Identification of Organic*

Compounds. 3th ed. New York, John Wiley & Sons, (1948).
p. 116-117.

25. HORWITZ, W. ed. — Official methods of analysis of association of official agriculture chemists. AOAC. 11th. ed. Washington, D.C., (1970).
26. —————.— Official methods of analysis of association of official agriculture chemists. AOAC. 9th ed. Washington, D.C., (1960).
27. LITWACK, G.—Experimental biochemistry. New York, John Wiley & Sons, (1960), p.12 e 52.
28. DISCHE, Z.—Color reactions of hexuronic acids. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, (1962), v.1, p.497-501.
29. HUNTER, M.J. - Peroxidase (liver). In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. ed. - Methods in enzymology. New York, Academic Press, (1955), v.2, p.792.
30. KREBS, K.G., HEUSSER, D. & WIMMER, H. - Spray reagents.

In: STAHL, E. ed. - Thin - layer chromatography. 2nd ed. New York, Springer, Verlag,(1969) , p.854-905.

31. PETROWITZ, H.S. & PATUSKA, G.—Über die kieselgelschicht - chromatographie gesättigter aliphatischer dicarbonsäuren. J. Chromatog. 7: 128,(1962).
32. ASPINALL, G.O. & JIANG, K.S. - Rapeseed hull pectin. Carboh. Res. 38: 247,(1974).
33. DURSO, D.F. & MUELLER, W.A. — Selection of solvent proportions for paper chromatography. Ethyl acetate - acetic acid - Water system. Anal. Chem. 28(9): 1366, (1956).
34. LAMBON, M.G. - Mobilities of some polyols, sugars, acids and other compounds. Anal. Chem. 29(10): 1449,(1957).
35. STAUB, A.M. - Removal of proteins. Sevag Method. In: WHISTLER, R.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, (1965), v. 5, p. 5-6.
36. BINKLEY, W.W. - Dialysis.—Isolation of sugars and related products by membrane diffusion. In: WHISTLER, R.L. ed.

Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, (1965), v.5, p. 54-55.

37. NORTHCOTE, D.H. — Zone electrophoresis. In: WHISTLER, R.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, (1965), v.5, p. 49-53.
38. NELSON, N. - A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375. (1944).
39. SOMOGYI, M. - A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160: 61, (1945).
40. ISHERWOOD, F.A. & JERMYN, M.A. - Relationship between the structure of the simple sugars and their behaviour on the paper chromatogram. Biochem. J. 48: 515, (1951).
41. McCOMB, E.A. & McCREADY, R.M. - Colorimetric determination of pectic substances. Anal. Chem. 24: 1630, (1952).
42. McCREADY, R.M. — α - D - Galacturonic acid monohydrate. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, (1963), v.2, p.27-29.

43. RICHTMYER, N.K. - Phenylosazones. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press,(1963), v.2, p. 127-131.
44. BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. - Hydrolysis of methylated polysaccharides. In: WHISTLER, R.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press,(1965), v.5, p. 296-298.
45. HIRST, E.L., HOUGH, L. & JONES, J.K.N. - Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part. II. The separation and determination of methylated aldoses. J. Chem. Soc., 928,(1949).
46. KOWKABANY, G.N. - Chromatography of carbohydrates and related compounds. In: HEFTMANN, E. ed. - Chromatography. New York, Reinhold Publishing Corporation,(1961), v.1, p. 510.
47. ASPINALL, G.O., JOHNSTON, M.J. & STEPHEN, A.M. - Plant gums of the gennus *Khaya*. Part II. The major component of *Khaya senegalensis* gum. J. Chem. Soc., 4918,(1960).

48. HAY, G.W., LEWIS, B.A. & SMITH, F. - Periodate oxidation of polysaccharides: General procedures. In: WHISTLER, R.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, (1965), v.5, p.357 - 361.
49. GOLDSTEIN, I. J., HAY, G. W., LEWIS, B.A. & SMITH, F. - Controlled degradation of polisaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, (1965), v.5, p.361-370.
50. WHITAKER, J.R. - Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. Anal. Chem., 35(12): 1950, (1963).
51. HODGE, J.E. & HOFREITER, B.T. - Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, (1962), v.1, p. 380-394.
52. JONES, J.K.N. & PERRY, M.B. - The structure of the type VIII Pneumococcus specific polysaccharide. J. Am. Chem. Soc., 79: 2787, (1957).

53. Be MILLER, J.N. - Acid catalyzed hydrolysis of glycosides.
In: WOLFROM, M.L. ed. - Advances in carbohydrate
chemistry. New York, Academic Press,(1967), v.22,
p. 25-108.
54. MALAPRADE, M.L. - Oxydation de quelques polyalcools par
l'acide periodique. Compt. Rend. 186: 382,(1928).
55. KORTSCHAK, H. P. - Citrates and the viscosity of pectin
solutions. J.Am.Chem.Soc. 61: 681,(1939).
56. OWENS, H.S., LOTZKAR, H., MERRILL, R.C. & PETERSON, M. -
Viscosities of pectin solutions. J.Am.Chem.Soc. 66:
1178,(1944).
57. THOMAS, A.W. & MURRAY, H.A. - Gum arabic. J. Phys. Chem.
32, 676,(1928).
58. CARLSON, W.A. & ZIEGENFUSS, E.M. - The effect of sugar
on guar gum as a thickening agent. Food Technol.
19(6): 64,(1965).
59. KORTSCHAK, H.P. - Electrolytes and the viscosity of pectin
solutions. J. Am. Chem. Soc. 61: 2313,(1939).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ANDRÉ TOSELLO, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, pelas facilidades proporcionadas ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. PAULO ANNA BOBBIO, pela orientação desta Tese.

Ao Engenheiro Agrônomo EDGARD CAIELLI da Estação Experimental - Central de Nova Odessa - SP. pela doação e classificação da palma gigante.

A todos que direta ou indiretamente nos auxiliaram na realização deste trabalho.