

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

ESTRUTURA DO POLISSACARÍDEO DO CARAGUATÁ

(Bromelia faustosa, Lindl)

Adilma R.P. Scamparini  
Engenheiro de Alimentos

ORIENTADOR:

Prof. Florinda O. Bobbio

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

-1980-

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha mãe,

ao Cid,

ã Adriana

## Í N D I C E

	pag.
RESUMO	i
SUMMARY	iii
1. - INTRODUÇÃO	1
2. - REVISÃO DA LITERATURA	2
3. - MATERIAL	22
4. - MÉTODOS E RESULTADOS	25
5. - DISCUSSÃO	41
6. - CONCLUSÕES	55
7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. - ILUSTRAÇÕES	68

## RESUMO

Do fruto do caraguatá (Bromelia faustuosa Lindl) foi extraído um polissacarídeo, que depois de purificado foi submetido a várias reações para o estudo de sua estrutura.

Da hidrólise total do polissacarídeo em meio ácido, foram obtidos somente galactose, xilose e arabinose. Foi verificada a ausência de ácidos urônicos.

Por hidrólise parcial do polissacarídeo foi obtido um polissacarídeo degradado, de menor peso molecular. Tanto o polissacarídeo, quanto o polissacarídeo degradado foram submetidos a reações de metilação e oxidação com periodato de sódio.

Do polissacarídeo degradado também foram feitos espectros de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$ .

Foram ainda verificados os sentidos dos ângulos de rotação dos dois polissacarídeos.

O peso molecular do polissacarídeo foi determinado por

ultracentrifugação.

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

## SUMMARY

A polysaccharide was isolated from the fruit of "caraguata" (Bromelia faustosa Lindl). Methylation analysis and periodate oxidation revealed that the polysaccharide has a branched structure consisting of D-galactopyranose, D-xylopyranose, L-arabinopyranose and L-arabinofuranose residues.

$^{13}\text{C}$  N.m.r. spectroscopy was used to assign the configuration of anomeric carbons as well the positions of substituents in the monosaccharide residues.

The molecular weight of the polysaccharide was determined by ultracentrifugation.

## 1. INTRODUÇÃO

Polissacarídeos têm grande e crescente importância na tecnologia de alimentos onde são essenciais pelas suas propriedades reológicas.

A importância da determinação das estruturas dos polissacarídeos, torna-se evidente, uma vez que as propriedades reológicas desses compostos estão diretamente ligadas as respectivas estruturas.

A Bromelia em estudo, contém um polissacarídeo de fácil extração, cuja solução em água é altamente viscosa que poderia ter largo emprego na indústria de alimentos.

O polissacarídeo extraído do caraguatã, depois de purificado foi submetido aos métodos clássicos de determinação de estrutura. Além disso o polissacarídeo foi hidrolisado parcialmente e o polissacarídeo degradado, submetido à espectroscopia de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$ .

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Hampton et al (1), em 1929, hidrolisaram a xilana extraída de determinado tipo de grama, a "oran esparto", com ácido nítrico diluído obtendo 93% de xilose. Por metilação do polissacarídeo e posterior hidrólise do produto metilado, os autores verificaram que as posições 2 e 3 estavam livres, e que as posições 4 e 5 poderiam, ou estar ligadas a outras unidades de xilose ou fazer parte do anel. Baseados nesses resultados e levando em consideração a estabilidade do polissacarídeo, Hampton et al (1) propuseram para as unidades de xilose a forma piranosídica.

Pelo valor de  $\alpha_D = -109$  do polissacarídeo, os autores concluíram que as unidades de xilose estavam na forma  $\beta$ .

Em 1931, Haworth e Percival (2) estudando a estrutura de uma xilana empregando metilação em meio alcalino, seguida de acetólise, obtiveram um dissacarídeo que foi desacetilado, e em seguida oxidado com água de bromo. O ácido formado nessa reação foi metilado e esterificado; por hidrólise desse produto foi obtido a 2 : 3 : 4 - trimetil - xilopiranoose que foi identificada pelo ponto de fusão, análise elementar de carbono e hidrogênio e análise de grupos metoxílicos.



Colson et al (3), em 1974, empregou a espectroscopia de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  no estudo das estruturas de várias dextranas lineares e ciclodextrinas, por comparação com espectros da D-glicose, e de derivados metilados e oligossacarídeos da glicose. Os autores verificaram também a influência do ambiente nos deslocamentos químicos dos carbonos não só anoméricos, mas também de átomos de carbono em outras posições, como é o caso de C-4 nas ciclodextrinas e glicanas lineares.

Gorin (4), em 1975, no estudo da estrutura da manana da Rhodotorula glutinis, empregou a ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$ . O espectro obtido mostrou 12 picos; o autor atribuiu os picos a 101,6 e 98,7 ppm aos carbonos anoméricos e picos a 62,7 e 62,3 ppm ao carbono na posição 6. Para a identificação dos outros sinais o autor preparou três mananas com os carbonos nas posições 3,5 e 6 deutérios e através da verificação de efeitos isotópicos  $\alpha$  e  $\beta$ , concluiu que a manana continha resíduos de  $\beta$ -D-manopiranosose ligados em 1 + 3 e 1 + 4.

O autor também verificou que o deslocamento de sinais de certos núcleos de  $^{13}\text{C}$  metilados eram semelhantes aos deslocamentos observados nesses mesmos núcleos quando ligados a outros resíduos de manose.

Baseado nesses dados, o autor concluiu que o deslocamento químico é influenciado por diversos fatores estruturais e portanto, um deslocamento químico é característico de uma determinada estrutura química.

Roy et al (5), em 1976, hidrolisaram o polissacarídeo da goma do Aegle marmelos obtendo um polissacarídeo degradado, composto de galactose, ramnose, arabinose e ácido galacturônico.

Os autores submeteram o polissacarídeo a reações de metilação e de oxidação com periodato seguida da degradação de Smith e degradação de Barry. Baseados nos resultados obtidos, os autores propuseram uma estrutura para a unidade repetitiva do polissacarídeo degradado.

Siddiqui e Wood (6), em 1976, obtiveram da Brassica campestris uma pectina, que por ultracentrifugação deu duas frações principais, que foram submetidas a reações de hidrólise total, e metilação seguida de hidrólise; os produtos obtidos nessas reações foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa.

Segundo os autores uma das frações (H) continha L-arabi

nose, D-xilose, D-galactose, L-ramnose e ácido galacturônico e através de estudos de metilação os autores mostraram que esta fração tinha uma estrutura altamente ramificada em diferentes posições.

Erbing et al (7), publicaram em 1976, os resultados dos estudos feitos com o polissacarídeo da Klebsiella tipo 1. Para a determinação da estrutura os autores empregaram metilação, espectro de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e oxidação com periodato de sódio. Os autores também hidrolisaram gradativamente o polissacarídeo, obtendo dois dissacarídeos e um trissacarídeo; esses oligossacarídeos, tiveram as respectivas estruturas elucidadas por meio de hidrólise enzimática, metilação e ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$ .

Os autores propuseram, baseados nos resultados, um trissacarídeo como unidade básica do polissacarídeo.

Seymour et al (8), em 1976, empregaram espectros de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  para a determinação de estruturas de uma série de dextranas, as quais haviam sido anteriormente determinadas quanto ao tipo e número de ramificações, por metilação. Os espectros mostraram que todas as ligações glicosídicas dessas dextranas eram em  $\alpha$ .

Correlacionando os picos na região entre 75 e 85 ppm, com os resultados obtidos na metilação, os autores estabeleceram que aqueles picos indicavam a presença de ligações  $\alpha$ -D(1 + 2),  $\alpha$ -D(1 + 3), ou ainda  $\alpha$ -D(1 + 4).

Foi verificado também, que o deslocamento químico observado dependia da temperatura ( $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ ). Os valores de  $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$  são positivos e estão dentro do intervalo de 0,01 a 0,03 ppm por grau Celsius, sendo que estes valores são maiores do que os valores observados para moléculas menores. Os autores observaram também que átomos de carbono não anoméricos, com prométicos em ligações glicosídicas, apresentavam um valor maior para  $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ .

Em 1976, Woolard et al (9) verificaram que um dos polissacarídeos, extraído da casca do sorgo, era constituído de L-arabinose, D-xilose, ácido glucurônico, ácido 4-O-metil glucurônico na seguinte proporção molar: 15 : 18 : 2 : 1. Através de estudos de metilação, de oxidação por periodato e por trióxido de cromo, de hidrólise parcial e de estudos de ressonância nuclear magnética de protons, os autores concluíram que o polissacarídeo era constituído de uma cadeia principal de resíduos de  $\beta$ -D(1 + 4) xilopiranosose ligados em algumas posições 2 a resíduos ácidos, e ligados a resíduos não redutores de  $\alpha$ -L-arabinofuranose nas posições 3, e em

alguns casos nas posições 2 e 3. Segundo os autores alguns resíduos de L-arabinofuranose estavam substituídos nas posições 2 ou 3.

Segura e Duarte (10), em 1976, isolaram do caracol Strophocheilus oblongus um polissacarídeo, identificado pelos autores, como sendo uma galactana.

Dessa galactana, submetida a três degradações sequenciais de Smith, foi obtido um polissacarídeo de menor peso molecular, e de estrutura mais linear que o polissacarídeo inicial.

Por metilação do polissacarídeo degradado, os autores constataram que nesse polissacarídeo houve um aumento na porcentagem de 2, 4, 6 -tri- e diminuição nas porcentagens de 2, 3, 4, 6 -tetra- e 2, 4 -di-, e uma grande variação na quantidade de 2, 3, 4 -tri-O-metil-D-galactose, com relação ao polissacarídeo inicial. Segundo Segura e Duarte, os açúcares do polissacarídeo que dariam 2, 3, 4, 6 -tetra- e 2, 3, 4 -tri-O-metil-D-galactose, foram destruídos nas sucessivas degradações.

Com base nesses resultados, os autores sugerem que a degradação com periodato se dá através das extremidades não

reduzidas e de algumas unidades internas que vão sendo expostas, à medida que os resíduos finais vão sendo destruídos.

Em 1976, Heaney - Kieras e Chapman (11), estudando a estrutura do polissacarídeo extracelular de uma alga Porphyridium cruentum através da identificação dos produtos obtidos da hidrólise total do polissacarídeo, verificaram que o mesmo era constituído de galactose, xilose, glicose, ácido glicurônico e ácido 2-0-metil glicurônico, além de grupos sulfato.

As configurações da galactose, glicose e ácido glicurônico foram determinadas pelos autores, através de ensaios com enzimas, como sendo D e L para a galactose e D para a glicose e ácido glicurônico.

O polissacarídeo foi dessulfatado e tanto este, como o polissacarídeo natural foram oxidados com periodato, e os resultados obtidos mostraram que ambos foram igualmente sensíveis a oxidação.

Por hidrólise parcial do polissacarídeo, os autores isolaram três dissacarídeos que foram submetidos a reações de oxidação com tetraacetato de chumbo, seguida de redução

com hidreto de boro e sódio e os produtos das reações foram identificados por cromatografia em fase gasosa.

Com base nos resultados obtidos, Heaney - Kieras e Chapman sugeriram que no polissacarídeo estudado, as hexoses, os ácidos urônicos, e aproximadamente metade da xilose estariam ligados em 1 + 3.

No estudo das estruturas de polissacarídeos extraídos de Sporothrix schenckii Mendonça et al (12), em 1976, empregaram a hidrólise total, metilação, oxidação com periodato seguida de degradação de Smith e espectroscopia de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Os autores verificaram que S. schenckii nas diferentes fases de desenvolvimento sintetizam polissacarídeos com estruturas diferentes os quais têm a cadeia principal sempre constituída por manose, e as cadeias laterais formadas por diferentes proporções de ramnose, manose ou galactose.

Em 1977, Wilkie e Woo (13) estudaram a estrutura molecular de hemiceluloses extraídas de folhas de bambu, através de hidrólise total, metilação e hidrólise parcial. Os oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise parcial foram identificados pelos autores por cromatografia em papel.

Além disso, os oligossacarídeos foram submetidos a reações de hidrólise total e metilação.

Os resultados levaram os autores a concluir que a cadeia principal das hemiceluloses era formada por unidades de xilopiranoses ligadas em 1 + 4 com substituições nas posições 2 ou 3 por resíduos ou cadeias laterais.

Em 1977, Lindberg et al (14), no estudo do polissacarídeo da Klebsiella Tipo 37, empregaram reações de hidrólise, de metilação, de oxidação e de degradação, espectroscopia de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , sendo que o espectro de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$ , segundo os autores, não foi bem resolvido.

Baseados nos resultados obtidos, Lindberg et al, propuseram a estrutura do tetrassacarídeo que constituía a unidade repetitiva do polissacarídeo.

Dutton e Yang (15), em 1977, para a determinação da estrutura de um polissacarídeo ácido da Klebsiella sorotipo K-62 usaram espectroscopia de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e observaram que o espectro era pouco resolvido devido à viscosidade da solução. Os autores verificaram que quando o polissacarídeo foi brandamente despolimeriza



do e o produto obtido examinado por espectroscopia de ressonância nuclear magnética de prótons, a resolução aumentou e o espectro mostrou cinco sinais na região anômérica.

Os autores metilaram o polissacarídeo previamente reduzido e identificaram os produtos de hidrólise por cromatografia em fase gasosa-espectrometria de massa dos aldios acetilados. Os autores também hidrolisaram parcialmente o polissacarídeo, separaram os produtos obtidos por filtração em sephadex G-15 e analisaram a estrutura dos oligossacarídeos separados, por ressonância nuclear magnética de prótons, metilação, rotação ótica, hidrólise ácida e enzimática. Os produtos de oxidação do polissacarídeo foram analisados por Dutton e Yang por cromatografia em papel e em fase gasosa.

Com base nos resultados, os autores propuseram um pentasacarídeo, como unidade básica repetitiva do polissacarídeo.

Em 1977, Woolard et al (16) na determinação da estrutura de três frações de uma hemicelulose extraída da casca de grãos de sorgo, empregaram reações de hidrólise, metilação e oxidação com periodato de sódio e trióxido de cromo; fo

ram também determinados em cada fração: teor de nitrogênio, rotação ótica, grau de polimerização e peso equivalente. Baseados nos resultados obtidos os autores concluíram que os polissacarídeos eram formados por cadeias de  $\beta$ -D-xilopiranoses ligadas em 1 + 4, podendo ter algumas posições 3 ou 2 e 3, substituídas por L-arabinofuranose, e algumas posições 2 substituídas por ácido glicurônico.

Os mesmos autores observaram que as três frações de hemicelulose diferiam entre si apenas no grau de ramificação.

Em 1978, Bhattacharjee et al (17) estudaram os espectros de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  na região anomérica dos polissacarídeos agar,  $\kappa$ -carrageenan,  $\kappa$ -carrageenan parcialmente dessulfatada e  $\lambda$ -carrageenan.

Por comparação com modelos da literatura, os autores atribuíram, em cada caso os picos na região de 103,2 a 103,6 ppm aos C-1 da D-galactose ou D-galactose-4-sulfato. Para o agar, o sinal a 99,2 ppm foi atribuído ao C-1 do resíduo de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose. No caso de  $\kappa$ -carrageenan o sinal a 96,2 ppm foi atribuído ao C-1 do resíduo de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose e para  $\lambda$ -carrageenan o sinal a 93,1 ppm foi atribuído ao C-1 do resíduo de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose-2-sulfato.

Em 1978, Dutton e Mackie (18) estudaram a estrutura do polissacarídeo da Klebsiella sorotipo K-70, empregando hidrólise total e parcial, metilação do polissacarídeo, seguida de degradação alcalina e oxidação seguida de de gradação de Smith.

Os autores analisaram os espectros de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo e dos compostos obtidos a partir da hidrólise parcial, da de gradação alcalina e da degradação de Smith.

A configuração dos açúcares componentes do polissacarídeo foi determinada pela curva de dicroísmo circular.

Baseados nos resultados obtidos, os autores propuseram um hexassacarídeo linear, como unidade básica do polisacarídeo.

Em 1979, Mendonça - Previato et al (19), na determinação da estrutura dos polissacarídeos de Heptomonas samuelpe-soai empregaram rotação específica, metilação, oxidação e ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$ . Os autores também identificaram os oligossacarídeos obtidos na hidrólise parcial dos polissacarídeos originais.

Com base nos resultados obtidos os autores verificaram, que um dos polissacarídeos era uma manopiranana e o outro era uma glicuronoxilana ramificada.

Em 1979, Shashkov et al (20) aplicaram a espectroscopia de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  no estudo de heterooligossacarídeos isolados da substância H do grupo sanguíneo, cujas estruturas já haviam sido determinadas anteriormente como constituídas de galactose, 2-acetamido-2-desoxi-D-galactitol e fucose.

Para a análise, os autores se basearam em dados obtidos nos espectros de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  de metil-glicosídeos e oligossacarídeos de estruturas conhecidas.

Seymour et al (21), em 1979, empregaram espectros de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  no estudo da estrutura de duas frações de dextranas produzidas por Leuconostoc mesenteroides e que haviam sido previamente estabelecidas por reações de metilação e hidrólise.

Os autores obtiveram melhor resolução com o espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  obtido a  $90^{\circ}\text{C}$  em relação ao espectro obtido a  $34^{\circ}\text{C}$ .

Seymour et al verificaram que uma das frações apresentava substituições em 3 e 6 nas unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose, mas não resíduos com substituições apenas em 3.

Seymour e Julian (22), em 1979, empregaram espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier, no estudo da estrutura de uma série de dextranas. Os autores obtiveram significativos resultados por subtração do espectro da dextrana a ser estudada do espectro de uma dextrana linear usada como padrão.

Segundo Seymour e Julian, como neste método um polissacarídeo padrão é usado como linha de base, os espectros obtidos são diferenciais o que elimina o problema da seme-lhança entre os espectros de polissacarídeos mesmo os que apresentam estruturas muito diferentes entre si. Além disso por este método são obtidos espectros livres de ruído, e em curto tempo.

Em 1979, Kennedy et al (23), estudando o polissacarídeo extraído das cascas de semente de Plantago ovata Forsk, através de análise de metilação e hidrólise parcial com ácido, mostraram que o polissacarídeo tinha uma cadeia principal formada de resíduos de D-xilopiranosose ligados

em 1 + 4 e 1 + 3 os quais estariam substituídos ao acaso, nas posições 2 e 3 com arabinose, xilose e ácido 2-O-galacturonil-ramnose.

Em 1979, Joseleau e Marais (24) estudaram a estrutura do polissacarídeo capsular de Klebsiella K Tipo 63 por meio de metilação, oxidação com periodato, degradação alcalina e ressonância nuclear magnética de <sup>13</sup>C.

Para a espectroscopia de ressonância nuclear magnética de <sup>13</sup>C os autores hidrolisaram parcialmente o polissacarídeo, para que fôsse diminuída a viscosidade e aumentada a solubilidade da amostra e assim pudessem ser obtidas soluções com concentrações mais altas.

Os autores encontraram dificuldade em identificar os sinais do espectro de ressonância nuclear magnética de <sup>13</sup>C e atribuíram essa dificuldade ao fato do polissacarídeo ser formado por três resíduos diferentes.

Em 1980, Dutton e Folkman (25) na determinação da estrutura do polissacarídeo capsular da Klebsiella sorotipo K-44 empregaram metilação, degradação alcalina do polissacarídeo metilado e identificação dos compostos formados na degradação de Smith.

Os autores também estudaram os oligossacarídeos formados por hidrólise parcial, através de metilação, ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa.

Para a obtenção dos espectros de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo, os autores fizeram uma despolimerização branda para que fosse obtida uma solução menos viscosa.

Dutton e Folkman concluíram que o polissacarídeo era formado por unidades repetitivas de um pentassacarídeo linear contendo grupos acetílicos.

Em 1980, O'Neil e Selvendran (26), estudando polissacarídeos da parede celular de tecidos parenquimatosos de dois tipos de feijão ("dwarf french" e "runner") empregaram três solventes diferentes para a extração: solução aquosa de desoxicolato de sódio, fenol-ácido acético-água e sulfóxido de dimetila-água. As composições em monossacarídeos, dos polissacarídeos extraídos pelos diferentes métodos foram muito semelhantes e cada preparação continha pequena mas significativa quantidade de glicoproteínas.

Por análise de metilação os autores identificaram nos polissacarídeos: ácido galacturônico, glicose, galactose e xilose com ligações em 4; arabinose com ligação na posição 5 e ramnose ligada na posição 2 sendo que a ordem de concentração foi a seguinte: ácido galacturônico > glicose > galactose > arabinose > ramnose > xilose.

Os polissacarídeos continham ramificações nas posições 6 da glicose, 3 da arabinose e 4 da ramnose sendo que arabinose, xilose e galactose constituíam os resíduos terminais não redutores.

Em 1980, Makumoto e Yamaguchi (27) apresentaram maiores evidências para a estrutura de uma manofucogalactana obtida da fruta de Flammulina velutipes (Fr).

Os autores determinaram as estruturas dos oligossacarídeos obtidos na hidrólise parcial do polissacarídeo por reação de oxidação com periodato e posterior redução com hidreto de boro e sódio seguida de degradação de Smith. Os produtos obtidos da reação de oxidação foram analisados por cromatografia em fase gasosa.

Pelos resultados, os autores concluíram que a cadeia principal dos oligossacarídeos era formada de resíduos de



galactopirranose unidos em 1 + 6 e substituídos na posição 2 por resíduos ou cadeias de manose e fucose.

Em 1980, Valent et al (28) descreveram um novo método para a determinação da sequência de resíduos glicosídicos em polissacarídeos. O método consiste em reduzir, metilar e hidrolisar parcialmente o polissacarídeo.

Os oligossacarídeos obtidos são etilados, reduzidos e separados por cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa e identificados como derivados acetilados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa. Com este método é possível, segundo os autores, a distinção entre um resíduo piranosídico ligado em 4 e um resíduo furanosídico ligado em 5.

Segundo Valente et al, esta técnica não seria comprometida pela presença, no carboidrato a ser analisado, de ligações glicosídicas com maior ou menor facilidade de serem hidrolisadas por ácido e além disso esta técnica sequencial teria como vantagens a sua relativa rapidez e a necessidade de apenas miligramas de amostra para a sua execução.

Gorin et al (29), em 1980, em continuação ao estudo da elucidação da estrutura do polissacarídeo obtido do Corynebacterium insidiosum, empregaram a metilação e espectros de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A composição do polissacarídeo já era conhecida, sendo constituída de D-glicose, D-galactose, L-fucose e ácido pirúvico.

Os sinais a 104,3 e 102,1 - 101,3 ppm (3C), foram atribuídos pelos autores e um resíduo ligado em  $\beta$  e três resíduos em  $\alpha$ . Na região de alto campo, foram observados sinais a 27,1 e 17,3 ppm (2C), que foram atribuídos aos carbonos metílicos do acetal do ácido pirúvico na configuração R e dos resíduos de L-fucose, respectivamente.

O espectro de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  não foi bem resolvido e neste apenas foram observadas uma constante de acoplamento de valor alto, que os autores atribuíram à forma  $\beta$ , e outras constantes de valor baixo, atribuídas à forma  $\alpha$ .

Baseados nos resultados dos espectros de ressonância nuclear magnética, de metilação e velocidade de hidrólise do polissacarídeo com ácido trifluoroacético, os autores propuseram a estrutura para a unidade básica do polissacarídeo.

Em 1980, Hranisavljević - Jakovljević et al (30) estudaram um polissacarídeo obtido por extração com álcali do líquen do carvalho (Cetraria islandica (L)). Os autores com base em estudos de metilação, oxidação com periodato e hidrólise parcial, mostraram que o polissacarídeo tem uma estrutura ramificada cuja cadeia principal é formada de resíduos de glicopirranose e ácido glicurônico ligados em 1 → 3 e resíduos de glicopirranose ligados em 1 → 4 e ou 1 → 6.

Por comparação dos oligossacarídeos obtidos na hidrólise parcial com oligossacarídeos padrões, os autores de demonstraram a predominância de ligações β, fato confirmado pela baixa rotação ótica e dados de espectro de infravermelho do polissacarídeo.

### 3. MATERIAL

#### 3.1. Caraguatã (frutos)

Os frutos do caraguatã, planta pertencente à família das Bromeliaceae (Bromelia faustuosa Lindl), utilizados neste trabalho, foram colhidos na Fazenda Santa Elisa, Campinas em junho de 1979.

#### 3.2. Reagentes

O etanol absoluto usado em tôdas as experiências foi um produto comercial com grau alcoólico de 99,5°GL.

Os açúcares usados como padrões foram produtos puros para a análise da marca Merck.

Os polióis (treitol e eritritol) e os aldeídos (glicolaldeído, gliceraldeído e formaldeído) utilizados como padrões na identificação dos produtos de hidrólise do polissacarídeo oxidado e reduzido foram produtos puros para a análise da marca Sigma.

Os glicosídeos usados para a preparação de derivados meti

lados da glicose, galactose, xilose e arabinose foram produtos puros para a análise da marca Sigma.

Os derivados metilados da glicose, galactose, xilose e arabinose foram preparados por metilação dos monossacarídeos e dos respectivos glicosídeos segundo Sandford e Conrad (31).

O material usado nos experimentos de cromatografia em camada delgada foi sílica gel G-60 da marca Merck.

Os demais reagentes utilizados neste trabalho foram produtos pró-análise das marcas Merck, Carlo Erba, Baker ou Alfa-Venturon.

### 3.3. Aparelhos

Os aparelhos utilizados neste trabalho foram:

- Balança Mettler modelo H-34.
- Espectrofotometro de absorção infravermelho Pye Unicam, modelo SP 1000.
- Centrífuga International, modelo K.

- Potenciômetro Metrohn Herisau E 512 com microeletrodo combinado.
- Evaporador rotatório Buchler Instruments, Inc.
- Estufa Fanem, modelo 320/1.
- Liofilizador Virtis modelo nº 10-146 MR-BA.
- Liofilizador Stokes modelo 24 F.O.
- Prensa manual hidráulica vertical Sardik com pressão máxima de 10 kgf/cm<sup>2</sup>.
- Cromatógrafo a gás Perkin Elmer modelo 990, equipado com dois detectores de ionização de chama.
- Espectrometro Varian XL-100-1S-FT (25,2 MHz).
- Ultracentrífuga Spinco Beckman modelo L-75.
- Espectrofotômetro de absorção de ultravioleta - visível Perkin Elmer modelo 356.
- Polarímetro fotoelétrico Carl Zeiss com 0,005<sup>o</sup> de exatidão.

#### 4. MÉTODOS E RESULTADOS

##### 4.1. Métodos químicos de análise.

###### 4.1.1. Umidade

A umidade foi determinada segundo o método 29006 descrito em AOAC (32).

###### 4.1.2. Cinzas

A determinação de cinzas foi feita segundo o método 29012, descrito em AOAC (32).

###### 4.1.3. Prova de Fehling

A reação de Fehling foi efetuada segundo o procedimento descrito por Litwack (33).

###### 4.1.4. Prova de Biureto

A reação de Biureto foi feita pelo método 22013 descrito em AOAC (32).

#### 4.1.5. Prova para ácidos urônicos

A prova para ácidos urônicos foi efetuada por reação com carbazol e ácido sulfúrico de acordo com o método descrito por McComb e McCready (34).

#### 4.2. Extração e purificação do polissacarídeo do caraguatã

O suco do caraguatã (que é onde se encontra o polissacarídeo) foi obtido por prensagem dos frutos em prensa hidráulica.

Várias cargas de frutos contendo cada uma 3 kg, foram prensadas separadamente, sendo que cada uma foi prensada três vezes. O suco de todas as cargas foram combinados dando um total de 10 litros. O suco, líquido viscoso, foi separado dos resíduos por filtração através de um pano fino.

No filtrado o polissacarídeo foi precipitado por adição de etanol absoluto, até uma concentração alcoólica de 75% v/v. O precipitado foi deixado em repouso por 24 horas, após o que foi filtrado através de um pano fino, lavado três vezes com etanol a 75%, uma vez com etanol absoluto, e finalmente com acetona e seco a 45°C em estufa a vácuo.



por 24 horas. O rendimento do processo foi 6%.

No produto obtido foram determinados teor de umidade e de cinzas, e feitas reações de Fehling, Biureto e para ácidos urônicos, com os seguintes resultados:

umidade	: 8,73%
cinzas	: 0,71%
reação de Fehling	: (+)
reação de Biureto	: (-)
reação para ácidos urônicos	: (-)

O polissacarídeo assim obtido foi dissolvido em água destilada e dialisado primeiro contra água destilada a 5°C por 48 horas e em seguida contra água desionizada a 5°C por 24 horas e a suspensão de polissacarídeo foi então liofilizada.

No polissacarídeo liofilizado (polissacarídeo I) foi feita reação de Fehling com resultado negativo.

#### 4.3. Hidrólise total do polissacarídeo I

Três gramas do polissacarídeo I foram adicionados a 100 ml de ácido clorídrico 1N e hidrolisados a 70°C por 16 horas.

A solução foi neutralizada com bicarbonato do sódio e desio-  
nizada pela adição de uma mistura em quantidades iguais das  
resinas Amberlite IR120, forma  $H^+$ , 28-35 mesh e Amberlite  
IR45, forma  $OH^-$ , 28-35 mesh. O material não retido nas re-  
sinas foi liofilizado e usado na identificação e na dosagem  
dos açúcares.

#### 4.4. Identificação dos produtos da hidrólise total do polis- sacarídeo I

##### 4.4.1. Identificação por cromatografia descendente em papel

Os monossacarídeos obtidos na hidrólise total do polissaca-  
rídeo I foram identificados por cromatografia descendente,  
durante 24 horas, em papel Whatman nº 1; o solvente emprega-  
do foi acetato de etila, piridina e água na proporção de  
8 : 2 : 1 (v/v) (35) e o revelador usado foi p-anisidina-áci-  
do ftálico (36).

Por comparação dos valores de  $R_G$  dos compostos obtidos na  
hidrólise com os  $R_G$  de açúcares padrão, foram identificados  
arabinose, xilose e galactose como os monossacarídeos consti-  
tuintes do polissacarídeo.

#### 4.4.2. Identificação por cromatografia em fase gasosa

Dos açúcares obtidos em 4.3. foram preparadas as oximas sililadas de acordo com o método de Mason e Slover (37), as quais foram empregadas na cromatografia gasosa.

O solvente usado para a adição da amostra no cromatógrafo foi o hexano.

A separação foi feita em colunas de aço inoxidável de 3,66 m x 2 mm d.i., empacotadas com 2% silicone OV-17, em Chromosorb W-AW-HMDS, de 80-100 mesh.

Como gás de arraste foi empregado nitrogênio com vazão de 30 mL min<sup>-1</sup>. As vazões de hidrogênio e ar, foram 35 mL min<sup>-1</sup> e 500 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente.

As temperaturas empregadas foram: detector 280°C; injetor 250°C; coluna inicialmente a 140°C por 21 minutos, depois programada a 4°C por minuto até atingir 192°C, seguida de programação a 6°C por minuto até 280°C.

A velocidade do papel no registrador foi de 5 mm. min<sup>-1</sup>.

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos

tempos de retenção dos produtos obtidos na hidrólise, com os tempos de retenção de açúcares padrão.

A figura 1 mostra o cromatograma obtido.

#### 4.5. Dosagem dos monossacarídeos resultantes da hidrólise total do polissacarídeo I

Três amostras, contendo cada uma 40 mg do produto obtido em 4.3, às quais foram juntados 10 mg de inositol (padrão interno) foram cromatografadas de acordo com o método descrito em 4.4.2. De cada amostra foram feitos 5 cromatogramas.

A quantidade relativa dos açúcares foi determinada segundo Mason e Slover (37).

A relação molar mínima encontrada foi de 5 : 2 : 2 para galactose, xilose e arabinose respectivamente.

#### 4.6. Hidrólise gradativa do polissacarídeo I

A 3g do polissacarídeo liofilizado foram juntados 100 mL de ácido clorídrico 1N e a mistura deixada a 70°C; a cada 30 minutos foi retirada uma amostra de 5 mL até um máximo

de 16 horas. Cada amostra foi submetida à cromatografia em placas de sílica, previamente tratada com bissulfito de sódio e tampão de fosfato-citrato a pH 4,0, segundo o método de Pruden et al (38).

Ao mesmo tempo, junto com as amostras, foi cromatografada uma mistura contendo xilose, arabinose e galactose.

A revelação foi feita com p-anisidina: ácido ftálico (36).

Depois de 30 minutos houve aparecimento de galactose e arabinose; a xilose só foi observada depois de 120 minutos.

#### 4.7. Oxidação do polissacarídeo I e hidrólise

O polissacarídeo I foi tratado com periodato de sódio e em seguida com hidreto de boro e sódio segundo Fukagawa et al (39).

O produto obtido foi posteriormente hidrolisado, da maneira descrita em 4.3.

#### 4.8. Identificação dos produtos obtidos na oxidação e hidrólise do polissacarídeo I

#### 4.8.1. Identificação de aldeídos por cromatografia em camada delgada

O aldeído presente no hidrolisado obtido em 4.7 foi separado e identificado por cromatografia em placas de sílica de 0,25 mm de espessura, sendo o solvente empregado: benzeno, etanol, água e amônia na proporção de 200 : 47 : 15 : 1 v/v (fase superior) (40); como revelador foi empregada solução de 2,4 - dinitrofenil - hidrazina (36).

Por comparação do  $R_F$  do produto obtido, com os  $R_F$  de compostos padrão (formaldeído, glicocaldeído e gliceraldeído) foi identificado o glicocaldeído como o único aldeído presente.

#### 4.8.2. Identificação de polióis por cromatografia em papel

O poliól presente no hidrolisado obtido em 4.7, foi identificado por cromatografia ascendente em papel, tendo como solvente: butanol, piridina e água na proporção de 6 : 4 : 3 (v/v) (41).

O revelador usado foi nitrato de prata-hidróxido de sódio (36).

Ao mesmo tempo foram cromatografadas, amostras padrão de glicol, glicerol, treitol e eritritol.

Por comparação dos  $R_F$  dos compostos de hidrólise com os  $R_F$  de compostos padrão foi identificado o glicerol como o único poliol presente.

#### 4.8.3. Identificação por cromatografia em papel dos monossacarídeos recuperados

Os monossacarídeos recuperados em 4.7, foram identificados por cromatografia em papel, de maneira análoga à descrita em 4.4.1.

Por este método foram identificados xilose, arabinose e galactose.

#### 4.8.4. Identificação dos produtos de hidrólise por cromatografia em fase gasosa

A identificação dos produtos de hidrólise do polissacarídeo I oxidado (item 4.7), foi feita por cromatografia em fase gasosa dos derivados sililados, dos polióis e oximas obtidas a partir dos hidroxialdeídos.

As condições de operação foram análogas às descritas no item 4.4.2 com exceção da programação empregada: 90°C até 140°C a 4°C por minuto, isoterma a 140°C por 14 minutos e finalmente programação a 4°C por minuto até 192°C, seguida de programação a 6°C por minuto até 280°C.

A identificação foi feita pelos tempos de retenção dos compostos. (Figura 2).

#### 4.9. Dosagem dos monossacarídeos recuperados na oxidação com periodato de sódio do polissacarídeo I

A quantidade relativa de monossacarídeos que não sofreram oxidação com periodato de sódio, foi determinada por cromatografia gasosa, da maneira descrita em 4.5. A relação molar mínima encontrada foi de 2 : 1 : 1 para galactose, xilose e arabinose respectivamente.

#### 4.10. Dosagem de ácido fórmico produzido pela oxidação do polissacarídeo I com periodato de sódio

Cem miligramas do polissacarídeo I foram dissolvidos em 10 mL de água e o pH levado a 6,3 com NaOH 0,01N. A essa mistura foram adicionados 10 mL de solução 0,2M de periodato de sódio e a solução obtida foi mantida a 5°C por 72 ho



ras em ausência de luz.

A quantidade de ácido fórmico liberado depois de 72 horas, foi determinado por titulação potenciométrica de acordo com o método de Anderson et al (42).

O resultado obtido foi de 3 moles de ácido fórmico por unidade básica do polissacarídeo I.

#### 4.11. Metilação total do polissacarídeo I e hidrólise

Um grama do polissacarídeo I foi metilado com iodeto de metila em presença de sulfóxido de dimetila e hidreto de sódio e em seguida hidrolisado com ácido sulfúrico segundo o método descrito por Sandford e Conrad (31).

#### 4.12. Identificação dos produtos obtidos na hidrólise do polissacarídeo I metilado

Os produtos obtidos em 4.11 foram analisados por cromatografia descendente em papel Whatman nº 1 tendo como solvente a fase superior da mistura: n-butanol; etanol; amônia e água na proporção de 40 : 10 : 1 : 49 (v/v) (43) e por cromatografia em placas de sílica gel G de 0,25 mm de espessura.

Para a cromatografia em camada delgada foram empregados três sistemas diferentes de solvente: éter diisopropílico e metanol na proporção de 5 : 1 (v/v) (44); acetona e benzeno na proporção de 1 : 1 (v/v) (45) e benzeno, etanol, água e amônia na proporção de 200 : 47 : 15 : 1 (v/v) (40).

Como revelador, para os cromatogramas tanto em papel como em camada delgada, foi usada solução de p-anisidina-ácido ftálico (36).

Entre os produtos de hidrólise do polissacarídeo I metilado, foram identificados por comparação dos respectivos  $R_F$  e  $R_G$  com os valores de compostos-padrão: 2, 3, 4, 6 tetra-O-metil galactose e 2, 3, 5 tri-O-metil arabinose; por comparação com valores da literatura (46) foi identificado o 2, 3, 4 -tri-O-metil galactose.

#### 4.13. Estudo da estrutura do polissacarídeo por ressonância nuclear magnética de $^{13}C$

##### 4.13.1. Hidrólise parcial do polissacarídeo I

Três amostras de 6g cada uma do polissacarídeo I foram adicionadas separadamente a 200 mL de ácido clorídrico 1N e aquecidas a 70°C por 2,4 e 6 horas respectivamente após o que cada solução foi dialisada contra água destilada a 5°C por 48 ho

ras seguida de diálise contra água desionizada a 5°C por 24 horas.

Em seguida, de cada amostra foi precipitado o polissacarídeo degradado por adição de álcool 85%; as suspensões foram deixadas em repouso por 24 horas e em seguida filtradas. Os precipitados separados foram lavados três vezes com etanol 85%, uma vez com etanol absoluto, finalmente com acetona e mantidos em dessecador a vácuo por 24 horas.

#### 4.13.2. Espectros de ressonância nuclear magnética de $^{13}\text{C}$ dos polissacarídeos degradados

A 500 mg de cada polissacarídeo obtido em 4.13.1, foram adicionados 3,0 mL de  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  1v : 1v e as suspensões centrifugadas a 2000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi retirado e colocado em tubo especial para espectroscopia de ressonância nuclear magnética de 12 mm de diâmetro contendo 0,1 ml de sulfoxido de dimetila, usado como padrão interno.

Os espectros foram feitos à temperaturas de 70 - 80°C, com um número de acumulações de 150.000 - 200.000, tempo de aquisição 0,8 segundos, intervalo entre os pulsos 0,2 segundos, pw 10-45  $\mu$ segundos.

O melhor espectro foi obtido com o polissacarídeo hidrolisado durante 6 horas (Polissacarídeo II) o qual foi usado para a interpretação (Figura 5).

#### 4.14. Hidrólise total do polissacarídeo II

Três gramas do polissacarídeo II foram hidrolisados como descrito em 4.3 e os produtos de hidrólise foram identificados por cromatografia em fase gasosa de maneira analoga à descrita em 4.4.2.

Os monossacarídeos encontrados foram: galactose, xilose e arabinose (Figura 3).

#### 4.15. Dosagem dos monossacarídeos resultantes da hidrólise total do polissacarídeo II

A dosagem dos monossacarídeos obtidos em 4.14, foi feita por cromatografia em fase gasosa de acordo com o procedimento descrito em 4.5.

Os monossacarídeos existentes estão na proporção de 5 : 2 : 1 de galactose, xilose e arabinose respectivamente.

#### 4.16. Oxidação do polissacarídeo II e identificação dos produtos de hidrólise

A oxidação do polissacarídeo II com periodato e a identificação dos produtos de hidrólise, foram feitas por cromatografia em fase gasosa de acordo com os métodos descritos em 4.7 e 4.8.4, respectivamente. Foram identificados glicolaldeído, glicerol, arabinose, xilose e galactose (Figura 4).

#### 4.17. Dosagem dos monossacarídeos recuperados na oxidação com periodato de sódio do polissacarídeo II

A dosagem dos monossacarídeos recuperados em 4.16 foi feita de acordo com o procedimento descrito em 4.5.

A relação molar mínima encontrada, foi de 2 : 1 : 1 de galactose, arabinose e xilose respectivamente.

#### 4.18. Metilação do polissacarídeo II e identificação dos produtos de hidrólise

A metilação do polissacarídeo II e identificação dos produtos de hidrólise foram feitas de maneira análoga à descrita em 4.11 e 4.12 respectivamente.

Entre os produtos obtidos na hidrólise, foi identificada apenas a mancha correspondente à 2, 3, 4, 6 -tetra-O-metil galactose.

#### 4.19. Desvio do sentido do plano da luz polarizada pelos polissacarídeos I e II

Para a verificação do sentido do desvio da luz polarizada foram feitas soluções aquosas com concentrações aproximadas de 0,1% dos polissacarídeos I e II, que foram colocadas em tubos de polarímetro de 10 ml de capacidade e comprimento de 10 cm.

Foi observado que os polissacarídeos I e II desviam a luz polarizada para a esquerda (levorrotatória) e para a direita (dextrorrotatória) respectivamente.

#### 4.20. Determinação do peso molecular do polissacarídeo I

A determinação do peso molecular do polissacarídeo I foi feita por ultracentrifugação segundo o método descrito por Martin e Ames (47), sendo usado como padrão desidrogenase lática.

O valor do peso molecular obtido para o polissacarídeo I foi de 170.000  $\pm$  2000.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Métodos

O polissacarídeo foi obtido por precipitação com álcool do suco dos frutos, uma vez que pelo método usual que consiste em extração do polissacarídeo com água e precipitação com etanol, não foi possível a obtenção de um polissacarídeo livre dos flavonóides existentes no fruto.

As condições de hidrólise total do polissacarídeo foram estabelecidas após experiências prévias nas quais foram empregadas diferentes temperaturas e concentrações de ácido clo-rídrico, em diferentes tempos de reação. As condições empregadas neste trabalho foram as que deram maior rendimento e menor degradação dos monossacarídeos obtidos.

Na identificação e dosagem dos monossacarídeos obtidos na hidrólise total do polissacarídeo I e do polissacarídeo II, por cromatografia em fase gasosa foram empregados derivados sililados das oximas uma vez que por este método foi obtida melhor separação e também linearidade para a determinação quantitativa dos açúcares

Também este foi o método que apresentou melhor resolução na identificação dos compostos obtidos na oxidação do polissacarídeo I e polissacarídeo II.

Para estudos de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  foi empregado o polissacarídeo II por ser um produto de maior solubilidade em água e formar soluções de menor viscosidade.

## 5.2. Resultados

Por hidrólise total em meio ácido do polissacarídeo I e do polissacarídeo II, foram obtidos como mostra os itens 4.5. e 4.15, somente galactose, xilose e arabinose, nas proporções de 5 : 2 : 2 e 5 : 2 : 1 respectivamente.

A maior frequência na natureza de galactose e xilose na configuração D e arabinose na configuração L e o sentido do ângulo de rotação do polissacarídeo I para a esquerda e do polissacarídeo II para a direita (4.19), permitem propor para a galactose e a xilose no polissacarídeo estudado a configuração D e para a arabinose a configuração L.

O espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  (Figura 5)



mostra picos em 98,1 ppm e 101,5 a 103,7 ppm bem separados de outros sinais e que se referem aos deslocamentos químicos de carbonos anoméricos.

Com base nos valores de deslocamentos químicos de carbonos anoméricos de metil glicosídeos (48) podemos concluir que os picos a 101,5 - 103,7 ppm correspondem a carbonos anoméricos com ligações C-H axiais e o pico a 98,1 ppm corresponde a carbonos anoméricos com ligações C-H equatoriais.

A dosagem dos monossacarídeos obtidos na hidrólise total do polissacarídeo II (4.15) mostra que nesse polissacarídeo, existe maior quantidade de galactose e xilose do que de arabinose. Este fato aliado ao fato de que, o espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  pode ser quantitativo quando se refere a carbonos iguais (49), permite a suposição que o pico a 98,1 ppm seja referente a arabinose e os picos entre 101,5 - 103,7 ppm sejam referentes a xilose e a galactose, e portanto todos os monossacarídeos no polissacarídeo II, estariam ligados em  $\beta$ .

Por oxidação dos polissacarídeos I e II com periodato seguido do tratamento com hidreto de boro e sódio e posterior hidrólise, foram obtidos ácido fórmico (4.10), glicolaldeí-

do e glicerol além de galactose, xilose e arabinose (Figuras 2 e 4). A presença de galactose, xilose e arabinose indicam que existem no polissacarídeo resíduos desses açúcares sem grupos hidroxílicos vicinais e que portanto não seriam oxidados pelo periodato de sódio.

O ácido fórmico formado, que corresponde a 3 moles por unidade básica de polissacarídeo I poderia ter sido proveniente de unidades de galactose na forma piranosídica ligadas nas posições 1 e 6, sem outras ramificações, ou de resíduos terminais não redutores de galactose.

A detecção de 2, 3, 4, 6 -tetra-O-metil galactose na hidrólise dos polissacarídeos I e II totalmente metilados, com prova a presença de galactopiranoses nas extremidades não redutoras desses polissacarídeos (4.12 e 4.18).

A presença no polissacarídeo I totalmente metilado de galactose na forma piranosídica com ligações em 1 e 6 foi comprovada por comparação dos valores de  $R_G$  do derivado 2, 3, 4 -tri-O-metil galactose com os valores de  $R_G$  obtidos em trabalhos anteriores em nosso laboratório (46). Essas mesmas unidades de galactose poderiam produzir, além do ácido fórmico, glicerol e glicolaldeído.

Se os grupos hidroxílicos nas posições 2 e 3 da galactose na forma piranosídica estivessem livres e a posição 4 estivesse comprometida em ligações glicosídicas, na oxidação com periodato haveria a formação de treitol, o que não foi observado.

Se os grupos hidroxílicos nas posições 3 e 4 da galactose estivessem livres e o grupo hidroxílico na posição 2 estivesse ligado, haveria a formação de glicerol e gliceraldeído mas apenas o glicerol foi identificado no hidrolisado dos polissacarídeos I e II quando submetidos à oxidação (Figuras 2 e 4).

O 2, 3, 5, 6 -tetra-O-metil galactose não foi encontrado entre os produtos de hidrólise dos polissacarídeos I e II totalmente metilados, o que indica que na extremidade não redutora desses polissacarídeos não existe a galactose na forma furanosídica.

Entre os produtos de oxidação dos polissacarídeos I e II não foi encontrado formaldeído, o que também mostra a não existência nesses polissacarídeos, da galactose na forma furanosídica, como resíduo terminal não redutor. Neste caso, a verificação da presença de formaldeído foi feita antes da

redução dos produtos formados na oxidação com periodato.

Também pelo espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo II foi verificada a ausência de sinais no intervalo de 77,9 - 98,1 ppm (Figura 5), e com base nos valores de C-4 de  $\alpha$  e  $\beta$  metil galactofuranosídeos (50), verificamos a ausência de galactose furanosídica neste polissacarídeo.

O fato da galactose furanosídica não participar do resíduo terminal não redutor do polissacarídeo I e de não ser detectada no polissacarídeo II, além da galactose estar presente nas mesmas quantidades nas unidades básicas dos dois polissacarídeos (4.5 e 4.15) mostra que toda galactose presente no polissacarídeo está na forma piranosídica.

A ausência nos polissacarídeos I e II de unidades de galactose totalmente substituídas, foi provada pela não recuperação de galactose, nos hidrolisados dos polissacarídeos metilados.

O espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo II (Figura 5) mostra dois picos, um a 62,2 e outro a 62,5 ppm que são atribuídos a grupos hidroxílicos pri

mários de hexopiranoses (48) indicando que no polissacarídeo II existem unidades de galactose com grupos hidroxílicos livres na posição 6.

O fato de no espectro aparecerem os dois picos (62,2 e 62,5 ppm), indica que os grupos hidroxílicos primários estariam em ambientes diferentes (3), ou seja, poderiam existir dois tipos de resíduos de galactose com o grupo hidroxílico do C-6 livre.

Esses resíduos poderiam ser provenientes da extremidade não redutora dos polissacarídeos, ou de unidades de galactose substituídas nas posições 1 e 3; 1, 3 e 4; 1, 2 e 3; 1, 2 e 4 ou 1, 2, 3 e 4.

O espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo II (Figura 5) mostra que não há picos na região compreendida entre 77,9 e 98,1 ppm, portanto por comparação com o valor de deslocamento químico do C-3 do metil-3-O-metil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo que estaria localizado nessa região (51) fica eliminada a possibilidade de ligação em 3 para a galactose.

Como também já foi verificada a existência de grupos hidro-

xílicos livres no C-6 da galactose, para que os resíduos deste açúcar não sejam oxidados eles deverão estar ligados nas posições 1, 2 e 4.

Os deslocamentos químicos de um resíduo de  $\beta$ -D-galactopiranosose substituído em 1, 2, 4 (20) confirma a existência deste resíduo no polissacarídeo II.

Se nos polissacarídeos I e II houvessem resíduos de xilose na forma furanosídica, para que estes resíduos formassem glicerol e glicolaldeído na oxidação com periodato seria necessário que os mesmos fizessem parte ou da extremidade não redutora desses polissacarídeos ou estivessem ligados nas posições 1 e 5.

De fato entre os produtos de hidrólise dos polissacarídeo I e II metilados não foram encontrados 2, 3, 4 -tri-O-metil xilose e 2, 3, 5 -tri-O-metil xilose indicando que a xilose tanto na forma piranosídica como na forma furanosídica não faz parte dos resíduos da extremidade não redutora dos polissacarídeos. Ainda, se a xilose na forma piranosídica fizesse parte da extremidade não redutora dos polissacarídeos, na oxidação desses compostos com periodato e reações posteriores haveria a forma-

ção de glicol, o que não foi observado.

Como já foi visto o espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo II não mostrou picos na região compreendida entre 77,9 e 98,1 ppm (Figura 5) que é a região onde aparecem os picos correspondentes à posição C-4 de  $\alpha$  e  $\beta$  xilofuranoses (50) o que confirma a não existência de unidades de xilofuranose no polissacarídeo II.

Para que o glicerol e glicolaldeído encontrados na oxidação com periodato dos polissacarídeos I e II fossem provenientes das unidades de xilose na forma piranosídica seria necessário que os grupos hidroxílicos nas posições 2 e 3 dessas unidades estivessem livres. De fato, no espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo II (Figura 5) foram encontrados picos correspondentes aos encontrados para carbonos de uma  $\beta$ -D-(1+4) xilopiranosana (19).

Como foi observado que na oxidação com periodato dos polissacarídeos I e II (Figuras 2 e 4) parte da xilose foi recuperada, para que isso seja possível devem existir nos polissacarídeos unidades de xilose substituídas em 1 e 3; 1, 2 e 4; 1, 2 e 3; 1, 3 e 4; ou 1, 2, 3 e 4. Esta última hipótese pode ser eliminada já que a xilose não foi encontrada como

produto de hidrólise dos polissacarídeos I e II metilados.

Com base no fato de que os valores de deslocamentos químicos para os carbonos são aproximadamente os mesmos para a xilose e glicose, com exceção do C-5 (48), podemos usar para a  $\beta$ -D-xilose substituída os valores de substituição encontrados para a  $\beta$ -D-glicose.

A substituição do grupo hidroxílico do C-3 da D-glicose por um grupo metoxílico, desloca este carbono em direção a campo mais baixo, de um valor aproximado de 9 ppm, e portanto o valor do C-3 da glicose iria para a região de 86 ppm (52). Correlacionando o mesmo valor para a  $\beta$ -D-xilose deveriam existir no espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo II, picos na região de 86 ppm o que não foi observado (Figura 5), indicando ausência de substituições no C-3 da xilose. Portanto as unidades de xilose devem estar substituídas nas posições 2 e 4.

A presença de arabinose na forma furanosídica como resíduo terminal não redutor no polissacarídeo I foi indicada pela identificação de 2, 3, 5-tri-O-metil arabinose na hidrólise total do polissacarídeo permetilado (4.12). Esse metil derivado não foi encontrado na hidrólise total do polissacarídeo II permetilado.



No espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo II não existem picos no intervalo compreendido entre 82 e 85 ppm (Figura 5) que seria a região correspondente ao C-4 de resíduos de  $\alpha$  e  $\beta$  arabinofuranose (50).

Entre os produtos de hidrólise dos polissacarídeos I e II metilados não foi encontrado a 2, 3, 4 -tri-O-metil-arabinose indicando que a arabinose na forma piranosídica não faz parte da extremidade não redutora desses polissacarídeos.

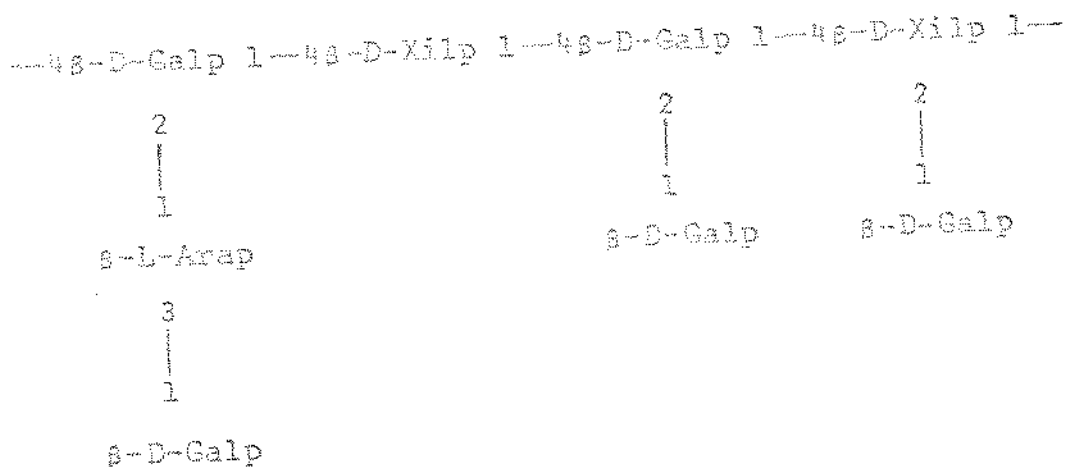
Além disso se a arabinopiranosose fizesse parte do resíduo terminal não redutor, na oxidação com periodato e redução com hidreto de boro e sódio haveria a formação de glicol o que não foi observado. Na hidrólise do polissacarídeo II oxidado com periodato foi recuperada a arabinose, o que significa que esse monossacarídeo pode ter ligações em 1 e 3; 1, 3 e 4; 1, 2 e 4 ou 1, 2, 3 e 4. Esta última hipótese pode ser eliminada já que a arabinose não foi encontrada como produto de hidrólise dos polissacarídeos I e II metilados.

Se também for considerado: que as proporções dos monossacarídeos no polissacarídeo II, antes e depois da oxidação com periodato, são diferentes (4.15 e 4.17); que as unidades de xilose e galactose para não sofrerem oxidação devem ter ligações em 1, 2 e 4; que a galactose faz parte da extremi-

dade não redutora do polissacarídeo II; que as unidades de xilose que sofrem oxidação devem ter ligações em 1 e 4, a única possibilidade de substituição para a arabinose seria nas posições 1 e 3.

O fato da arabinose ter ligações em 1 e 3, confirma a suposição anteriormente feita, de que esse monossacarídeo deve estar na forma  $\beta$ , já que se ele estivesse na forma  $\alpha$ , haveria no espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo II, picos na região entre 77,9 e 98,1 ppm uma vez que os deslocamentos químicos dos carbonos da arabinose seriam semelhantes aos deslocamentos observados para a galactose (48).

Com base nos resultados obtidos foi possível a proposição de uma estrutura para a "unidade básica" do polissacarídeo II; representada abaixo e na Figura 6.

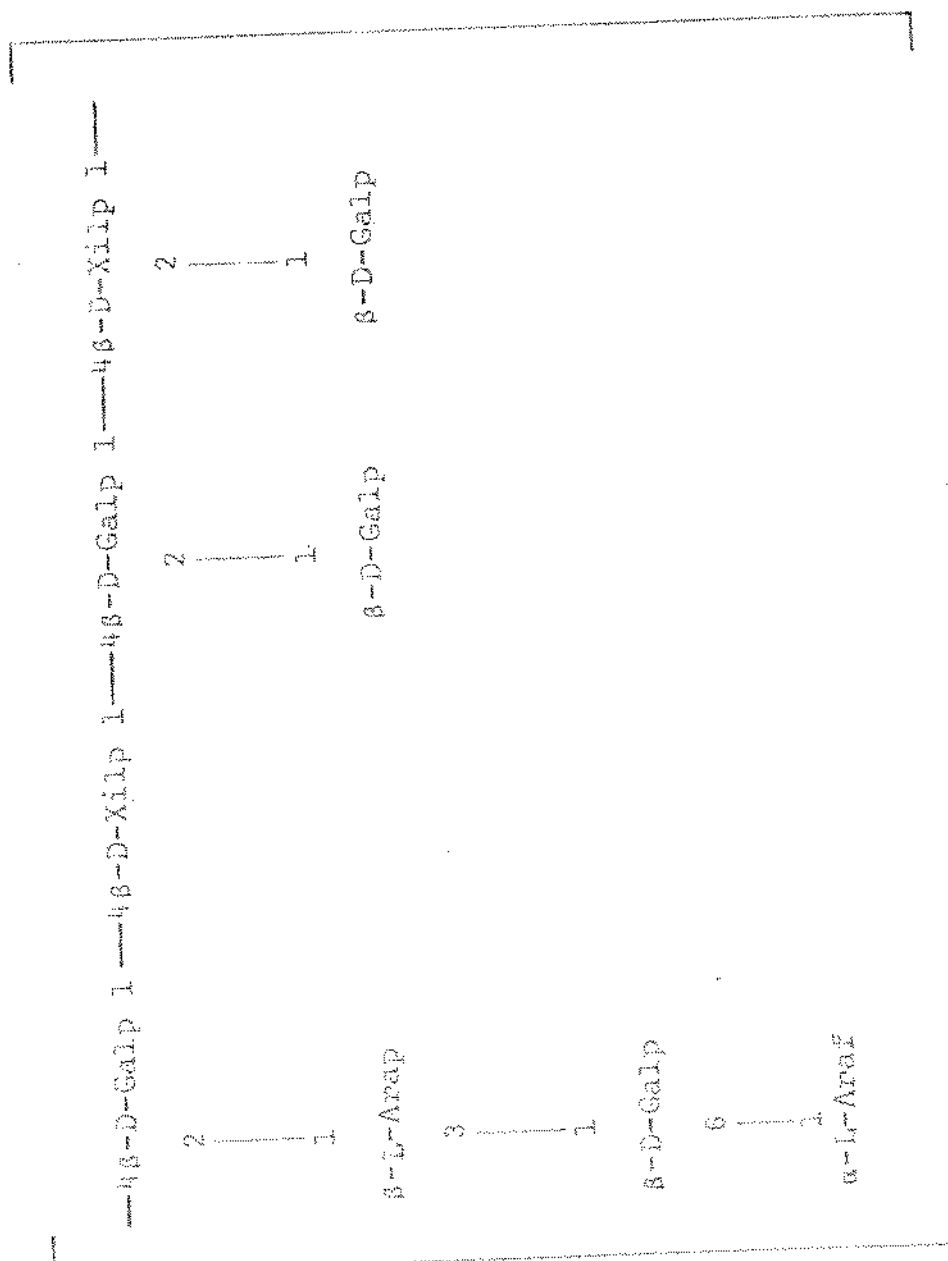


Essa estrutura justifica o grande número de absorções no espectro de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  para a região anomérica  $\beta$ .

Na hidrólise do polissacarídeo I depois de 30 minutos de reação, foi observada a presença apenas de arabinose e galactose que estariam fazendo parte da extremidade não redutora do polissacarídeo I, enquanto que a xilose só foi observada após 120 minutos de reação (4.6).

Para a proposição da estrutura do polissacarídeo I deve ser levado em consideração as proporções dos diferentes monossacarídeos nos polissacarídeos I e II (5 : 2 : 2 e 5 : 2 : 1 respectivamente), a presença de arabinofuranose na extremidade não redutora do polissacarídeo I (4.12), a presença de resíduos de galactose com ligações em 1 e 6 (4.12) e a mudança do sentido do desvio do plano da luz polarizada (4.20).

Esses fatos permitem para o polissacarídeo I a estrutura representada na página seguinte e na Figura 7.



n = 127

## 6. CONCLUSÕES

1. O polissacarídeo isolado dos frutos do caraguatá contém somente: D-galactose, D-xilose e L-arabinose na seguinte proporção 5 : 2 : 2.
2. As unidades de galactose e xilose estão na forma piranosídica e as unidades de arabinose estão na forma piranosídica e furanosídica.
3. Todos os monossacarídeos na forma piranosídica estão ligados em  $\beta$  enquanto que as unidades de arabinofuranoses estão ligadas em  $\alpha$ .
4. A cadeia principal do polissacarídeo é constituída por unidades de D-galactose e D-xilose com ligações glicosídicas 1  $\rightarrow$  4.
5. Todas as unidades de D-galactose e metade das unidades de D-xilose têm substituições na posição 2.
6. As cadeias laterais do polissacarídeo são formadas por unidades de D-galactopiranosose, L-arabinopiranosose e L-arabinofuranose.

7. Algumas unidades de D-galactopiranosose estão ligadas em 1 e 6.
8. As unidades de L-arabinopiranosose estão ligadas nas posições 1 e 3.
9. Os resíduos terminais não redutores do polissacarídeo são constituídos por D-galactopiranososes e L-arabinofuranoses.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hampton, H.A.; Haworth, N.W. e Hirst, E.L. "Polysaccharides. Part IV. The constitution of xylan". J. Chem. Soc. 1929, 1739-1753.
2. Haworth, W.N. e Percival, E.G.V. "Polysaccharides . Part IX. Evidence of pyranose structure of xylan". J. Chem. Soc. 1931, 2850-2854.
3. Colson, P.; Jennings, H.J. e Smith, I.C.P. "Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon-13 nuclear magnetic resonance". J. Am. Chem. Soc. 96 (26), 8081-8087 (1974).
4. Gorin, P.A.J. "Assignment of signals of the carbon-13 magnetic resonance spectrum of a selected polysaccharide: Comments on methodology". Carbohyd. Res. 39, 3-10, (1975).
5. Roy, A.; Bhattacharya, S.B.; Mukherjee, A.K. e Rao, C.V.N. "The structure of degraded bael (Aegle marmelos) gum". Carbohyd Res. 50, 87-96 (1976).

6. Siddiqui, I.R. e Wood, P.J. "Structural investigation of oxalate-soluble rapeseed (Brassica campestris), polysaccharides. Part IV. Pectic polysaccharides". Carbohyd. Res. 50, 97-107, (1976).
7. Erbing, C.; Kenne, L.; Lindberg, B.; Lönnngren, J. e Sutherland, I.W. "Structural studies of the capsular polysaccharide from Klebsiella Type 1". Carbohyd. Res. 50, 113-120 (1976).
8. Seymour, F.R.; Knapp, R.D. e Bishop, S.H. "Determination of the structure of dextran by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy". Carbohyd. Res. 51, 179-194 (1976).
9. Woolard, G.R.; Rathbone, E.B. e Novellie, L. "Structural studies on a glucuronoarabinoxylan from the husk of sorghum grain". Carbohyd. Res. 51, 239-247 (1976).
10. Segura, E.A.D. e Duarte, J.H. "Methylation studies of the polysaccharides resulting from sequential Smith-degradations of the galactan from the snail Strophocheilus oblongus". Carbohyd. Res. 52, 159-167 (1976).



11. Heaney - Kieras, J. e Chapman, D.J. "Structural studies on the extracellular polysaccharide of the red alga, Porphyridium cruentum". Carbohyd. Res. 52, 169-177 (1976).
12. Mendonça, L.; Gorin, P.A.J.; Lloyd, K.O. e Travassos, L.R. "Polymorphism of Sporothrix schenckii surface polysaccharides as a function of morphological differentiation". Carbohyd. Res. 15, 2423-2431 (1976).
13. Wilkie, K.C.B. e Woo, S. "A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses". Carbohyd. Res. 57, 145-162 (1977).
14. Lindberg, B.; Lindqvist, B.; Lönngren, J. e Kimmich, W. "Structural studies of the capsular polysaccharide of Klebsiella Type 37". Carbohyd. Res. 58, 443-451 (1977).
15. Dutton, G.G.S. e Yang, M. "Structural investigation of Klebsiella serotype K 52 polysaccharide". Carbohyd. Res. 58, 179-192 (1977).

16. Woolard, G.R.; Rathbone, E.B. e Novellie, L.  
"Structural studies on three hemicellulose B  
fractions from the husk of sorghum grain".  
Carbohydr. Res. 59, 547-552 (1977).
17. Bhattacharjee, S.S.; Yaphe, W. e Hamer, G.K. "<sup>13</sup>C-N.m.r.  
spectroscopic analysis of agar, κ-carrageenan  
and ι-carrageenan". Carbohydr. Res. 60, C1 - C3,  
(1978).
18. Dutton, G.G.S. e Mackie, K.L. "Structural investi-  
gation of Klebsiella serotype K 70 polysacchari-  
de". Carbohydr. Res. 62, 321-335 (1978).
19. Mendonça - Previato, L.; Gorin, P.A.J. e Previato,  
J.O. "Investigations on polysaccharide compo-  
nents of cells of Herpetomonas samuelpessoai  
grown on various media". Biochemistry 18,  
149-154 (1979).
20. Shashkov, A.S.; Arbatsky, N.P.; Derzetskaya, V.A. e  
Kochetkov, N.K. "Application of <sup>13</sup>C-n.m.r.  
spectroscopy in the structural study of complex  
hetero-oligosaccharides". Carbohydr. Res. 72,  
218-221 (1979).

21. Seymour, F.R.; Knapp, R.D.; Chen, E.C.M.; Bishop, S.H. e Jeanes, A. "Structural analysis of Leuconostoc dextrans containing 3-O- $\alpha$ -D-glucosylated  $\alpha$ -D-glucosyl residues in both linear - chain and branch - point positions, or only in branch - point positions, by methylation and by  $^{13}\text{C}$ -N.m.r. spectroscopy". Carbohydr. Res. 74, 41-62 (1979).
22. Seymour, F.R. e Julian, R.L. "Fourier - transform, infra red difference - spectrometry for structural analysis of dextrans". Carbohydr. Res. 74, 63-75 (1979).
23. Kennedy, J.F.; Sandhu, J.S. e Southgate, D.A.T. "Structural data for the carbohydrate of ispaghula husk ex Plantago ovata Forsk". Carbohydr. Res. 75, 265-274 (1979).
24. Joseleau, P.J. e Marais, M.F. "Structure of the capsular polysaccharide of Klebsiella K Type 63". Carbohydr. Res. 77, 183-190 (1979).
25. Dutton, G.G.S. e Folkman, T.E. "Structural investigation of the capsular polysaccharide of Klebsiella serotype K 44". Carbohydr. Res. 78, 305-315 (1980).
26. O'Neill, M.A. e Selvendran, R.R. "Methylation analysis of cell-wall material from parenchymatous tissues of

Phaseolus vulgaris and Phaseolus coccineus". Carbohyd. Res. 79, 115-124 (1980).

27. Mukumoto, T. e Yamaguchi, H. "Further evidence for the structure of a mannofucogalactan from the fruit bodies of Flammulina velutipes (Fr). Sing. Smith degradation of oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis". Carbohyd. Res. 79, 142-146 (1980).
28. Valente, B.S.; Darvill, A.G.; McNeil, M.; Robertsen, B.K. e Albersheim, P. "A general and sensitive chemical method for sequencin the glycosyl residues of complex carbohydrates". Carbohyd. Res. 79, 165-192 (1980).
29. Gorin, P.A.J.; Spencer, J.F.T.; Lindberg, B. e Lindh, F. "Sctstructure of the extracellular polysaccharide from Corynebacterium insidiosum". Carbohyd. Res. 79, 313-315 (1980).
30. Hranisavljević-Jakovljević, M.; Miljković-Stojanović, J.; Dimitrijević, R. e Mićović, V.M. "An alkali-soluble polyssaccharide from the oak lichen Cetraria islandica (L). Ach.". Carbohyd. Res. 80, 291-295 (1980).

31. Sandford, P.A. e Conrad, H.E. "The structure of the Aerobacter aerogenes A3 (S1) polysaccharide. I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis". Biochemistry 5, 1508-1517 (1966).
32. A.O.A.C. "Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists". Editor: William Horwitz. Washington, Association of Official Agricultural Chemists, 1960.
33. Litwack, G. "Experimental biochemistry". New York, John Wiley & Sons, 1960.
34. McComb, E.A. e McCready, R.M. "Colorimetric determination of pectic substances". Anal. Chem. 24, 1530-1532 (1952).
35. Aspinall, G.O. e Jiang, K.S. "Rapeseed hull pectin". Carbohydr. Res. 38, 247-255 (1974).
36. Krebs, K.G., Heusser, D. e Wimmer, H. "Spray reagents". In: Stahl, E. ed. Thin layer chromatography 2<sup>nd</sup> ed. New York, Springer, Verlag, 854-905 (1969).

37. Mason, B.S. e Slover, H.T. "A gas chromatographic method for the determination of sugar in foods". J. Agr. Food Chem. 19, 551-554 (1971).
38. Pruden, B.B.; Pineault, G. e Loutfi, H. "A thin-layer chromatographic method for the quantitative determination of D-mannose, D-glucose and D-galactose in aqueous solution". J. Chromatogr. 115, 477-483 (1975).
39. Fukagawa, K.; Yamaguchi, H.; Uotani, O.; Tsujimoto, T. e Yonezawa, D. "Structural studies on fucogalactan produced by Rhodotorula glutinis K-24: Characterization of acetyl ester and application of sequential periodate oxidation". Agr. Biol. Chem. 39, 1703-1710 (1975).
40. Hay, G.W.; Lewis, B.A. e Smith, F. "Thin-film chromatography in the study of carbohydrates". J. Chromatog. 11, 479-486 (1963).
41. Pazur, J.H. e Forsberg, L.S. "Determination of the sugar sequences and the glycosidic-bond arrangements of immunogenic heteroglycans". Carbohydr. Res. 60,

167-178 (1978).

42. Anderson, D.M.W.; Greenwood, C.T. e Hirst, E.L.

"Physicochemical studies on starches. Part II. The oxidation of starches by potassium metaperiodate". J. Chem. Soc. 1955, 225-231.

43. Hirst, E.L.; Hough, L. e 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. 1949, 928-933.

44. Tschesche, R. e Wulff, G. "Über saponine der spirostanolreihe - IX. Die konstitution des digitonins". Tetrahedron 19, 621-634 (1963).

45. Tschesche R. e Balle, G. "Über saponine der spirostanolreihe-X. Zur konstitution der samensaponine von Digitalis Lanata Ehrh". Tetrahedron 19, 2323-2332 (1963).

46. Reyes, F.G.R. "Polissacarídeo da palma gigante (Opuntia ficusindica, mill): Propriedades e estru

tura". Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas (1978).

47. Martin, R.G. e Ames, B.N. "A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to Protein mixtures". J. Biol. Chem. 236, 1372-1375 (1961).
48. Gorin, P.A.J. e Mazurek, M. "Further studies on the assignment of signals in <sup>13</sup>C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides". Can. J. Chem. 53, 1212-1222 (1975).
49. Perlin, A.S. "Carbon-13 NMR spectroscopy of carbohydrates". Int. Rev. Sci., Org. Chem. Ser. Two, 1976, 7, 1-34.
50. Ritchie, R.G.S.; Cyr, N.; Korsch, B.; Koch, H.J. e Perlin, A.S. "Carbon-13 chemical shifts of furanosides and cyclopentanols. Configurational and conformational influences". Can. J. Chem. 53, 1424-1433 (1975).



51. Voelter, W. e Breitmaier, E. "The influence of methylation on  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of galactose derivatives". Tetrahedron 29, 3845-3848 (1973).
52. Vignon, M.R. e Vottero, P.J.A. "RMN  $^{13}\text{C}$ : Sur l'utilisation des esters pour l'attribution des carbones des molecules glucidiques". Tetrahedron Letters 28, 2445-2448 (1976).

8. ILUSTRAÇÕES

- 1 - Arabinose
- 2 - Xilose
- 3 - Galactose

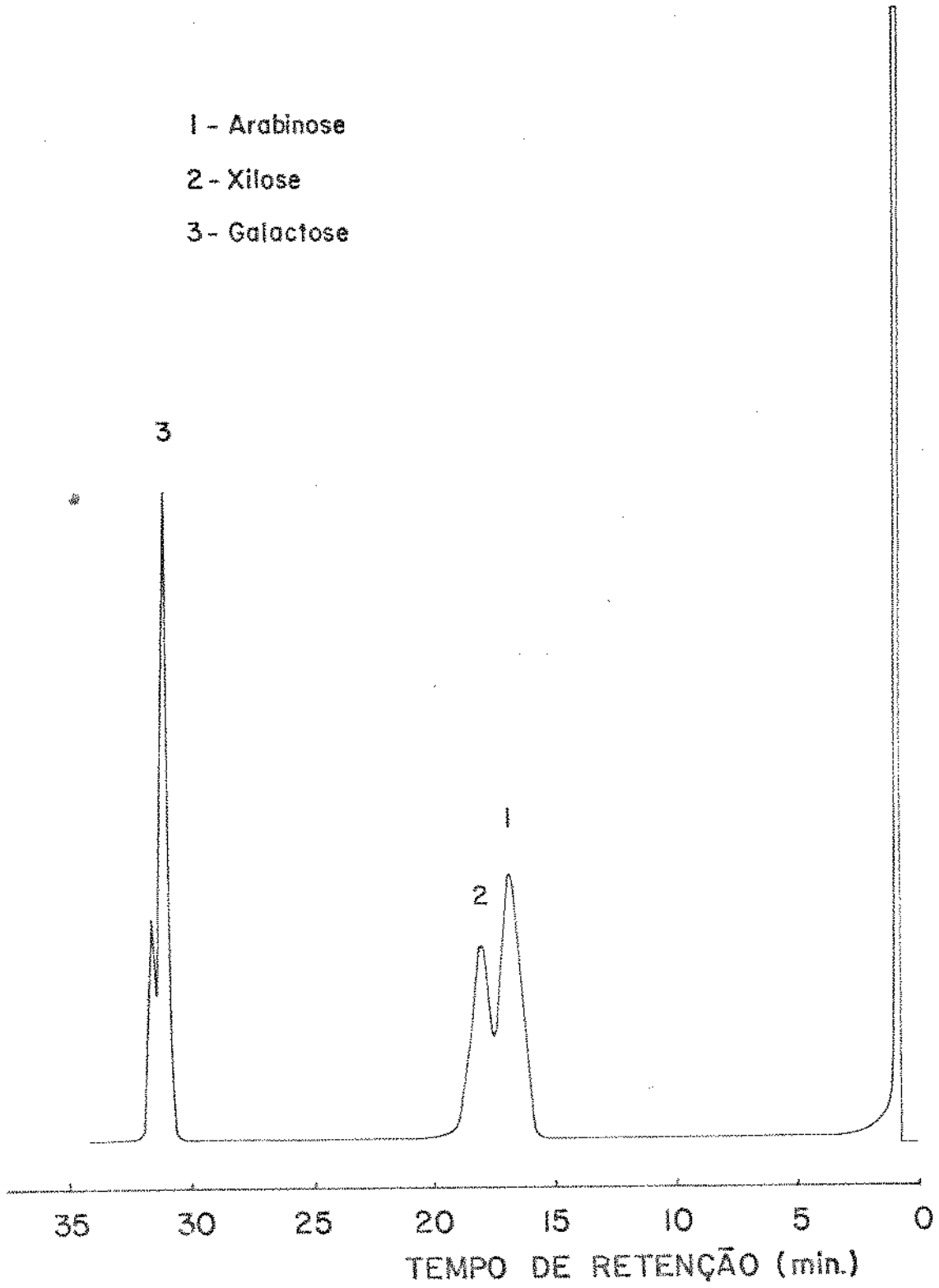


Figura 1: Cromatograma do hidrolisado do polissacarídeo I

- 1 - Glicolaldeido
- 2 - Glicerol
- 3 - Arabinose
- 4 - Xilose
- 5 - Galactose

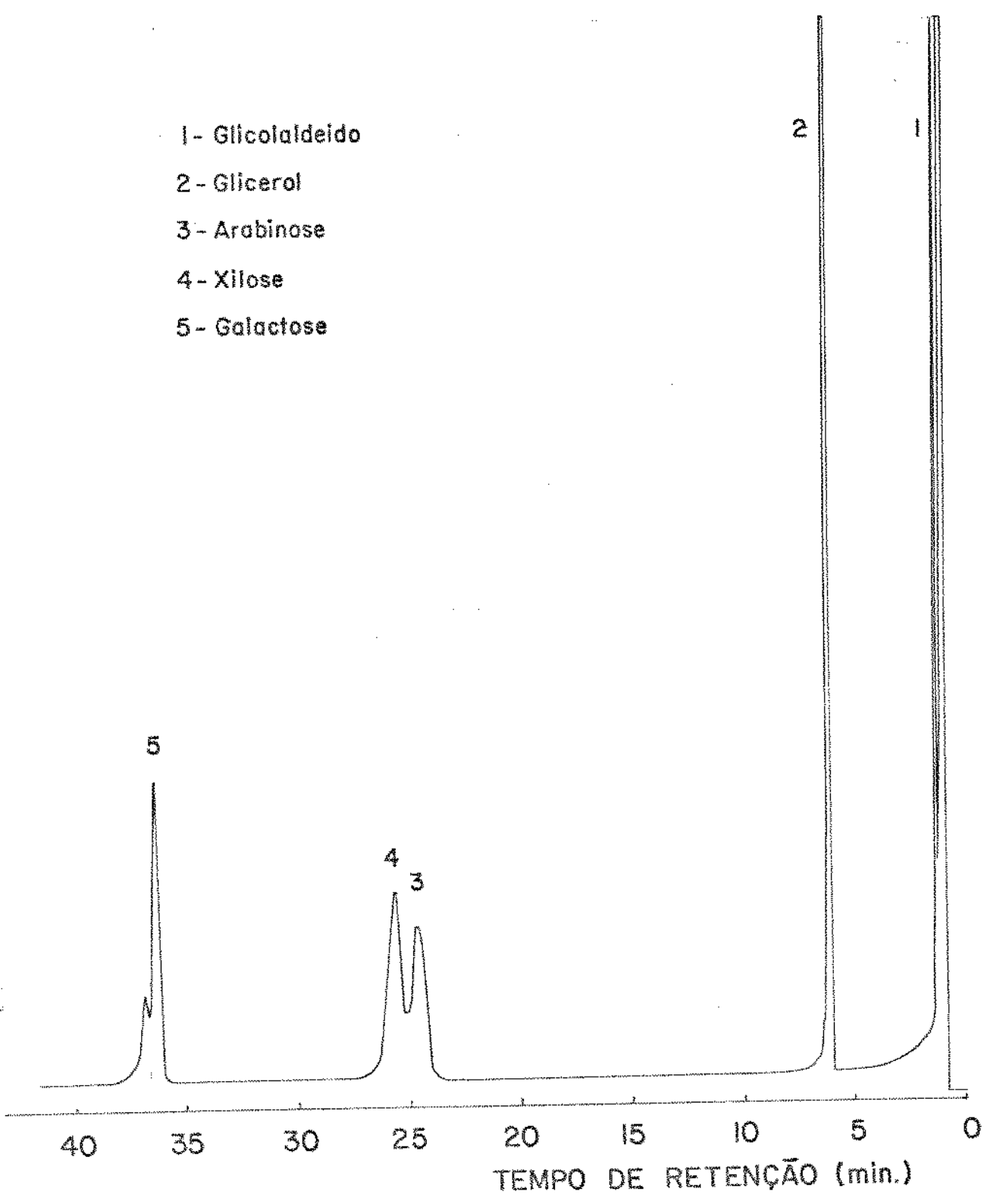


Figura 2: Cromatograma do hidrolisado do polissacarídeo I oxidado

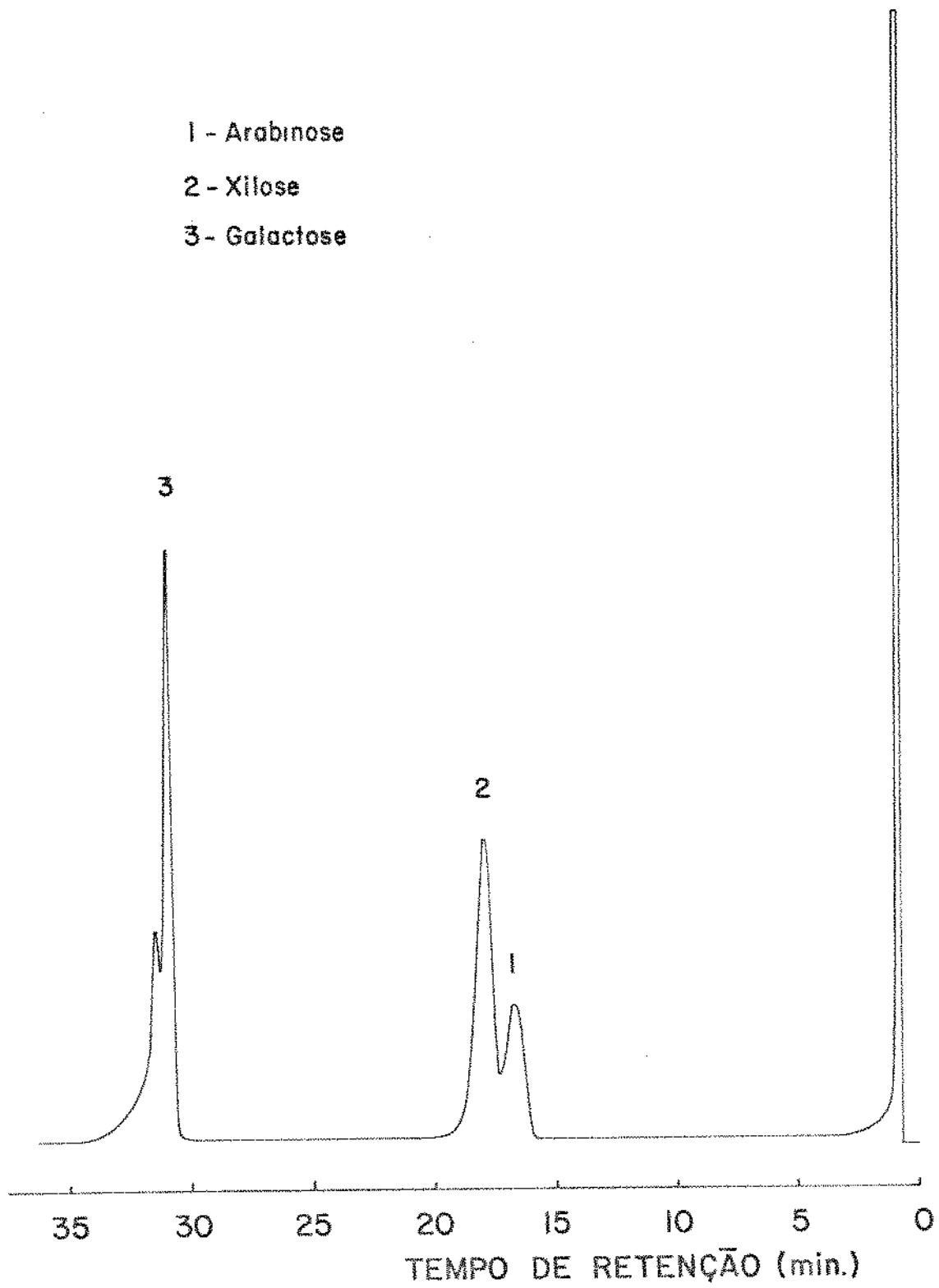


Figura 3: Cromatograma do hidrolisado do polissacarídeo II

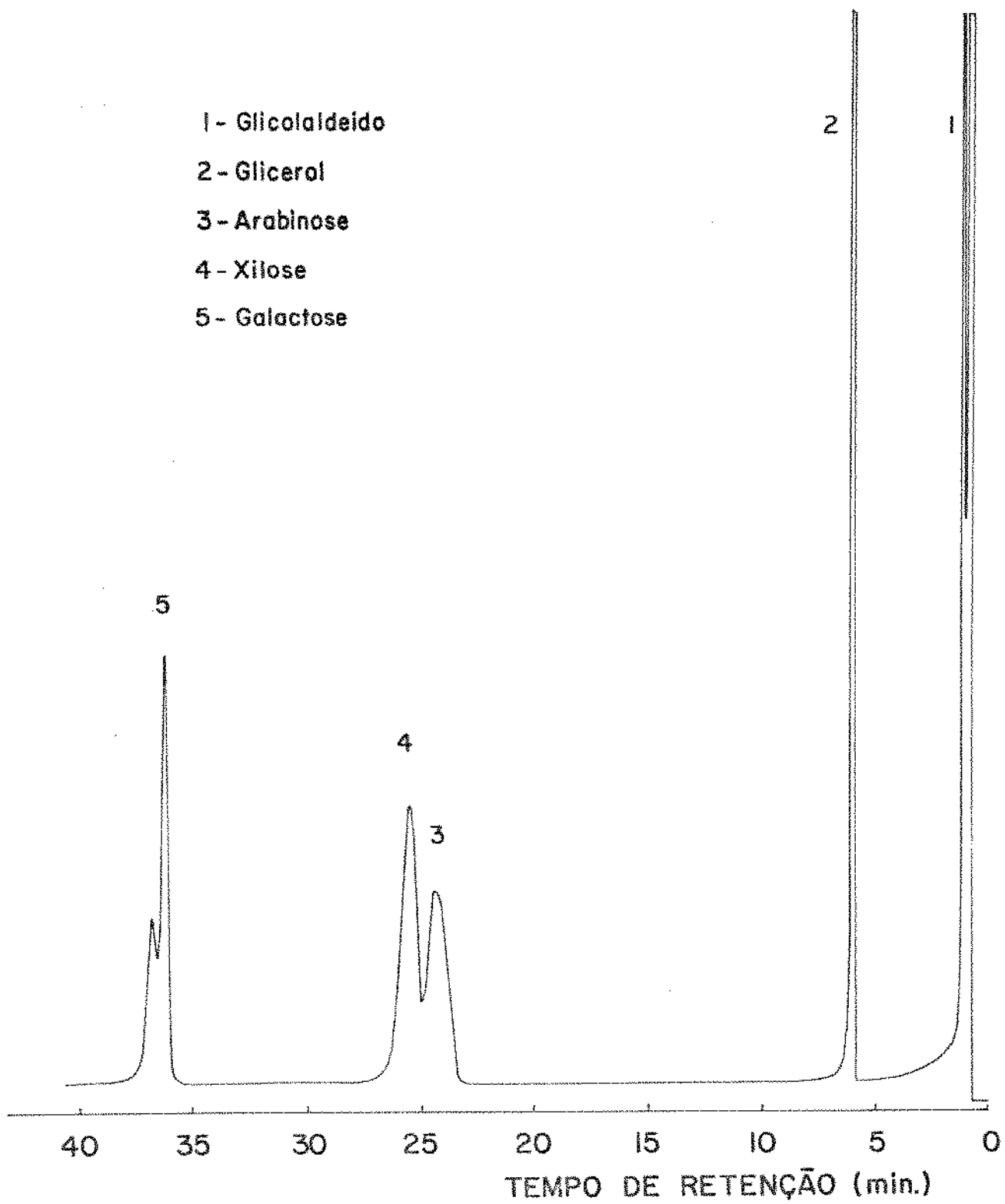


Figura 4: Cromatograma do hidrolisado do polissacarídeo II oxidado

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Florinda Orsatti Bobbio, pelo estímulo e dedicação demonstrados durante a orientação desta tese.

Ao Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pela determinação dos espectros de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  e valiosas sugestões na interpretação dos espectros.

À Profa. Dra. Maria Antonia Caleazzi, pela determinação do peso molecular do polissacarídeo.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, setor de Operações Unitárias, pela permissão do uso da prensa hidráulica e do liofilizador.

Ao Centro Experimental de Campinas (Fazenda Santa Eliza) pela doação dos frutos que possibilitaram a execução desta Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela

lo auxílio financeiro concedido para a execução deste  
trabalho.

A todos que direta ou indiretamente nos auxiliaram na rea-  
lização deste trabalho.