

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PARECER

*Este exemplar corresponde a redação final da
Tese desenvolvida por Tânia Guimarães Santa Rita e
aprovada pela Comissão Julgadora em 27.07.84.
Campinas, 27 de julho de 1984.*

[Assinatura]

Presidente da Banca

ESTUDO E ESTRUTURA DOS POLISSACARÍDIOS

DA ALOE AFRICANA Mill

Tania Guimarães Santa Rita
Farmacêutica-Bioquímica

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 Ciências de Alimentos.

- 1984 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ofereço esta tese de doutoramento aos meus companheiros...
da casa-

Fernanda,

Geraldo,

Ludu,

Maria,

Myriam,

Samanta e

Tatiana-

e do Mundo - porque fizeram, fazem e refazem, para que a
vida possa ser...

pois amigo é coisa para se guardar.

A G R A D E C I M E N T O

À professora Doutora Florinda Orsatti Bobbio pela orientação desta tese.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense que permitiu o afastamento durante parte do curso de Pós - Graduação.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, através de sua Direção e Coordenação de Pós-graduação, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho de tese.

À Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação - ABIA - pelo auxílio para a realização das xerocópias e as capas dos exemplares.

Ao convênio UFF/UNICAMP, através do Plano de Capacitação de Docentes, pelo suporte financeiro.

À técnica - Keiko Shimabukuro - do laboratório da Análise de Alimentos pela realização das análises de espectrofotometria de chama.

Aos colegas da Pós-graduação da FEAA - Durigan, Lucinha ,
Lucio, Marta, Paula, Penha, Rubens e Walter - e a turma da
Biodança - André, Profa. Clélia, Celeste, Cidinha, Cristi-
na, Darcy, Maria do Carmo, José Paulo, Joãozinho, Prof. Ser-
gio e Silvana - porque vivemos e desfrutamos juntos as ex-
periências.

À D.Alice, Claudinha, Elias, Josiane, D. Maria, Paulinho e
Silvana pela colaboração amiga.

Um especial agradecimento ao Dr Philip Gorin pelas determi-
nações dos espectros de RMC¹³ e CG-EM além de valiosas su-
gestões e também, Eliana Barreto Bergter, José Oswaldo Pre-
viato, Lucia Mendonça Previato e Paulo Antonio de Souza
Mourão pelas facilidades oferecidas nos seus laboratórios
de pesquisa.

À Célia Regina pelo paciente serviço de datilografia.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realiza-
ção deste trabalho.

Í N D I C E

Lista de tabelas	vi	
Lista de figuras	vii	
Folha de convenções	ix	
Resumo	x	
Summary	xiii	
1	Introdução	01
2	Revisão da literatura	03
3	Material	13
4	Métodos e resultados	15
5	Discussão	56
6	Conclusões	73
7	Referências bibliográficas	74

Lista de tabelas

Tabela 1 - Viscosidade de soluções 0,5% dos polissacarídios da <u>A.africana</u> , da pectina e do amido	24
Tabela 2 - Resultado de análise dos polisacarídios A e B da <u>A.africana</u> ..	33
Tabela 3 - Resultados da oxidação por unidade básica do polissacarídio B ..	37
Tabela 4 - Valores de identificação dos derivados metil-O-acetilados dos produtos de hidrólise do polissacarídio B	41

Lista de figuras

Figura 1 - Possíveis unidades básicas dos polisacarídeos A e B da <u>A.africana</u>	xii
Figura 2 - Esquema de extração e purificação dos polissacarídeos da <u>A.africana</u>	18
Figura 3 - Cromatograma dos alditois O-acetilados dos produtos de hidrólise do polissacarídeo B	32
Figura 4 - Cromatograma dos derivados alditois-O-acetilados do polissacarídeo B metilado, em CG-EM	42
Figura 5 - Espectro de massa referente ao pico 1.	43
Figura 6 - Espectro de massa referente ao pico 2	44
Figura 7 - Espectro de massa referente ao pico 3	45
Figura 8 - Espectro de massa referente ao pico 4	46

Figura 9 - Espectro de massa referente ao pico		
5		47
Figura 10- Espectro de massa referente ao pico		
6		48
Figura 11- Espectro de massa referente ao pico		
7		49
Figura 12- Espectro de massa referente ao pico		
8		50
Figura 13- Espectro na região do IV do políssa		
carídio A da <u>A.africana</u>		52
Figura 14- Espectro na região do IV do políssa		
carídio B da <u>A.africana</u>		53
Figura 15- Espectro de ressonância magnética de		
carbono ¹³ do polissacarídio B		55

Folha de convenções

IV	infravermelho
CP	cromatografia em papel
CCD	cromatografia em camada delgada
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa
RMP	ressonância magnética protônica
RMC ¹³	ressonância magnética de carbono ¹³
MP	mistura pura em polissacarídios
MPD	mistura pura degradada por base
Glu	glucose
Gal	galactose
Ara	arabinose
Man	manose
Gala	ácido galacturônico
TFA	trifluoroacético
TMS	tetrametilsilano
Cetavlon	brometo de trimetilcetilamônio
ACOR	acetato de etila
DAP	1,3 -diaminopropano
CBB	corante coomassie brilliant blue

R E S U M O

Do suco da falsa babosa - Aloe africana Mill, Família Liliaceae - foi extraída uma goma bruta contendo 6,5% de proteínas como impurezas. Após proteólise da goma com tripsina, foi obtida uma mistura pura de polissacarídios com rendimentos de 94% em base seca. A solução da mistura de biopolímeros mostrou comportamento pseudo-plástico e a viscosidade foi dependente do pH de suas soluções.

Por tratamento da mistura de polissacarídios com cetavlon' foi precipitado um polissacarídio em pequena proporção. No tratamento do sobrenadante com cloreto de cálcio, foi precipitado o polissacarídio A que mostrou ter uma estrutura formada, praticamente por resíduos de ácido α -D-galacturopiranoses 15,4% O-acetilados e com pequeno teor de esterres covalentes (1%).

O biopolímero que não precipitou como sal de cálcio foi denominado polissacarídio B e obtido numa proporção 9 vezes maior, em relação ao polissacarídio A. A hidrólise total mostrou que o polissacarídio B era formado por 43% de manose, 18% de galactose, 18% de glucose, 5% de arabinose além de conter 9,4% em ácido galacturônico e 6% em grupos O-acetílicos.

As estruturas parciais dos polissacarídios da Aloe africana foram estabelecidas com o uso além dos métodos clássicos de determinação, com os valores da ressonância magnética de carbono¹³, da espectroscopia na região do infravermelho, pela medida da rotação ótica e por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa.

Com base nos resultados obtidos foram propostas possíveis unidades básicas para 2 polissacarídios da Aloe africana (figura 1).

S U M M A R Y

From the juice Aloe africana Mill a mixture of polysaccharides was isolated. The polysaccharides were bound to a protein from which it was isolated by trypsin digestion of the crude mixture.

A solution of protein - free mixture of the polysaccharides behaved as a pseudo-plastic system. The polysaccharides were fractionated through the precipitation of calcium derivatives. Two fractions were obtained in the ratio of 9/1 (w/w).

The less abundant fraction "A" was basically a polygalacturonic acid containing 15,6% of acetyl groups. The more abundant fraction "B" was characterized as an acetylated heteropolysaccharide containing mannose, galactose, glucose, arabinose and galacturonic acid. The polysaccharide containing 6% of acetyl groups.

Possible structures for the basic units of the polysaccharides A and B were suggested.

1. INTRODUÇÃO

Polissacarídios têm grande importância na indústria de alimentos devido a suas propriedades reológicas. As soluções destes hidrocolóides podem formar bem como modificar a força dos géis, formar filmes além de ser usados como estabilizantes de emulsões. Desta forma estes polímeros de açúcar são funcionais, podendo melhorar a textura em produtos alimentícios.

Considerando que propriedades reológicas estão diretamente relacionadas às estruturas químicas destes compostos, com o conhecimento da composição polimérica podem ser feitas modificações o que cria possibilidades maiores de aplicação.

O presente estudo foi realizado com a Aloe africana, arbusto da família Liliaceae, espécie ainda não analisada em seus aspectos químicos, botânicos e farmacológicos que é utilizada apenas com finalidade ornamental no Brasil. Esta planta é conhecida vulgarmente como "falsa babosa".

Da Liliaceae em estudo foram isolados polissacarídios que dissolvidos em água apresentaram a capacidade espessante. As estruturas parciais dos polissacarídios da A. africana foram estabelecidas com o uso, além de métodos clássicos de determinação, da ressonância magnética do carbono¹³, a espectroscopia na região do infravermelho e a cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa.

No Brasil, a descoberta de fontes naturais de polissacarídios pode constituir-se num dos objetivos da Química de Alimentos desde que poucos destes biopolímeros são produzidos industrialmente no país.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O primeiro trabalho de determinação de estruturas de polisacarídios no gênero Aloe foi publicado em 1948 quando Roboz e Haagen-Smith (1) descreveram a composição do latex sêco da Aloe vera. Os autores, empregando a hidrólise total e identificação dos produtos de hidrólise, concluíram que o polissacarídio era constituído por quantidades equimoleculares de manose e glucose, tendo ainda 2,37% de ácidos urônicos.

Neste mesmo ano, um polissacarídio isolado de Ceratonia siliqua (goma locusta) foi estudada por Kudal e Gralen (2). Nas análises os autores empregaram a hidrólise total do polímero com análise por cromatografia em papel. Ficou estabelecido que o polissacarídio era formado por 80% de manose e 20% de galactose.

Em 1950, a estrutura química do polissacarídio extraído de Cyamopsis tetragonoloba (goma guar) foi descrita por Palmer e Ballantyne (3). Após hidrólise total e isolamento de derivados dos açúcares hidrolisados em cromatografia em papel, a estrutura foi definida como sendo uma galactomanana na proporção de 2:1 entre manose e galactose. Um trabalho posterior de Wistler e Durso (4), em 1952, estabeleceu para o polissacarídio da goma guar uma cadeia principal for-

mada por manoses, em ligações glicosídicas β a qual estariam ligadas unidades de galactose nas posições seis. Foi utilizado a hidrólise gradativa com H_2SO_4 diluído, eluição do hidrolisado em coluna de celulose, com posterior oxidação com periodato dos di e tri-sacarídeos isolados da coluna cromatográfica.

Em 1952, Kapoor(5) isolou um polissacarídeo das sementes da Delonix regia que identificou como sendo uma galactomana semelhante a goma guar. Para as identificações o autor usou a cromatografia em papel do polissacarídeo metilado e hidrolisado, espectroscopia infravermelha e valores de rotação ótica específica.

Dos tubérculos da Dioscorea batatas Tsukune, ainda em 1952, Misaki et alii(6) isolaram um polissacarídeo que após hidrólise foi analisado por cromatografias em papel, gasosa e por degradação de Smith. Com base nos resultados encontrados os autores sugeriram a estrutura de uma α -D-manana acetilada com ligações glicosídicas $1 \rightarrow 4$. Neste mesmo trabalho os autores citaram um estudo feito em Dioscorea batatas Icho, no qual a mucilagem isolada foi identificada como sendo uma mistura formada por 10% de proteínas, 48% de uma α -D-manana e 3% de compostos fosfatados.

A composição química do polissacarídeo de Bletilla striata

foi estudada por Tomoda et alii(7) em 1974. Para a identificação da estrutura, foram utilizadas a espectroscopia in fravermelha, a cromatografia em papel e gasosa dos produtos de hidrólise ácida do polissacarídeo. Com base nos resultados obtidos foi estabelecido para o polímero a estrutura de uma glucomana acetilada, na proporção de três para um de manose e glucose.

Em 1975, Orodova et alii(8) publicaram um trabalho sobre a estrutura do polissacarídeo obtido da Aloe arborencens. Neste trabalho os autores isolaram duas frações pectínicas , A e B, que variavam entre si apenas quanto ao teor de ácido galacturônico e grupos metoxílicos. A fração B foi identificada por hidrólise parcial ácida e enzimática; nos produtos de hidrólise foi identificado o ácido galacturônico por cromatografia de papel. Os autores não fazem referências a estrutura da fração A.

Ainda em 1975, a presença de uma manana acetilada em Lilia-ceae foi citada pela primeira vez, quando Tomoda et alii(9) estudaram o polissacarídeo extraído de Lilium auratum. A análise por cromatografia gasosa do polissacarídeo hidrolisado indicou as proporções de 69% para manose, 36% para glucose e 5,3% de grupos O-acetílicos. Os grupos O-acetilas estavam ligados ao acaso no polímero. Os autores estabeleceram que a maioria das ligações desta glucomanana eram

1 → 4 e possuíam a configuração glicosídica α .

Seymour et alii(10) isolaram polissacarídios do meio de cultura de 9 espécies de leveduras, que foram identificadas pelos autores como sendo α -D-mananas. Os resultados das análises feitas nos polímeros, após hidrólise total metilação e acetólise, mostraram que estes polissacarídios eram bastante ramificados com diferentes padrões de substituição na cadeia principal. As cadeias laterais tinham diferentes comprimentos.

Da parede celular de Streptomyces griseus foi isolada e identificada por Harris e Gray(11) uma manana com grupos metílicos e acetílicos na estrutura nativa. Para a identificação os autores usaram os dados obtidos da ressonância magnética protônica e da cromatografia em papel dos produtos de hidrólise do polissacarídio com alguns hidrogênios substituídos por trítio. A estrutura proposta foi a de uma longa cadeia de manoses ligadas em 1 → 4 com substituições nas posições três por grupos metílicos. As posições dos substituintes O-COCH₃ não foram determinadas pelos autores.

Em 1977, Maitra e Ballou(12) isolaram e identificaram oligossacarídios da parede celular de Mycobacterium smegmatis. Estes polímeros eram formados por cadeias com onze a quatorze resíduos de α -D-manoses ligadas em 1 → 4 com

grupos metílicos e acetílicos ligados, ao acaso, na cadeia. Estes resultados foram baseados em dados obtidos do espectro de ressonância magnética do próton e na identificação de produtos da hidrólise parcial, após degradação de Smith, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Da parede celular de Aspergillus niger, Bardalaye e Nordin (13) isolaram e identificaram, por meio da cromatografia gasosa, uma α -D-galactomanana cuja estrutura era formada por quantidades equimoleculares de galactose e manose. Os autores afirmaram, também, que a estrutura deveria estar ramificada somente nos resíduos de manose. Existiam em média 5 a 9 monossacarídeos por cadeia linear do polissacarídeo sem ramificações.

Em 1978, Paulsen et alii (14) extraíram um polissacarídeo da Aloe plicatilis Mill com rendimento bruto de 0,3% em base à matéria úmida. Empregando cromatografias em papel e gasosa dos açúcares isolados na hidrólise total, o polissacarídeo foi identificado como sendo uma glucomanana na proporção 2,8:1 para manose e glicose. Pelos dados obtidos da espectroscopia infravermelha do polissacarídeo, os autores indicaram a configuração β para as ligações entre os açúcares. A cadeia da glucomanana era substituída ao acaso por grupos acetílicos, havendo hexoses mono, di e tri-O-acetiladas e ainda resíduos de monômeros não substituídos.

Em 1978, Walter et alii(15) isolaram de Aloe barbadensis uma goma cuja composição química era D-glucose e D-manose além de ser também isolado desta planta um alcalóide cuja estrutura não foi descrita pelos autores.

Gouda et alii, em 1979(16) isolaram da Aloe vera quatro polissacarídeos que foram identificados como sendo glucomananas lineares acetiladas, com diferentes proporções entre os resíduos de glucose e manose e grupamentos acetílicos. Os autores observaram a presença de grupos O-fosfato em dois dos polissacarídeos isolados.

Os polissacarídeos isolados da parede celular de Ceratocystis paradoxa e fimbriata foram estudados por Alviano et alii em 1979(17). Para a identificação da estrutura dos polissacarídeos os autores empregaram, além dos métodos convencionais, a ressonância magnética protônica e de carbono¹³. Os polissacarídeos foram identificados como sendo mananas e glucomananas, sendo sempre a cadeia principal dos polímeros formada por α -D-manoses ligadas em $1 \rightarrow 6$.

Os autores também concluíram que em algumas das posições dois da cadeia principal das mananas havia ramificações formadas por cadeias de manoses, ligadas em $1 \rightarrow 2$ e $1 \rightarrow 3$.

Em 1980, Gowda(18) extraiu da Aloe saponaria e da Aloe van

balenii dois polissacarídeos com rendimentos brutos de 0,45% e 0,25%, respectivamente. Após hidrólise total e análise em cromatografia gasosa e em papel dos produtos obtidos, os polissacarídeos foram identificados como sendo galactoglucomananas lineares com ligações glicosídicas em 1 → 4. As análises quantitativas em cromatografia gasosa indicaram as proporções molares de 1:4:5 na espécie saponária e 1:2:2 na espécie vanbalenii para galactose, glucose e manose, respectivamente.

Em 1980, Gaurhari e Dás (19,20) determinaram as estruturas de dois polissacarídeos em Aloe barbadensis. Para a determinação das estruturas dos polímeros os autores se basearam nos resultados obtidos após hidrólise total, metilação exaustiva e oxidação com periodato. Um dos polissacarídeos foi identificado como sendo uma β-D-galactana(19) ramificada, contendo ainda 3,8 de ácido galacturônico. A posição dos resíduos galacturônicos não foi indicada pelos autores. Os autores sugeriram para o outro polissacarídeo isolado da A. barbadensis a estrutura de uma β-D-glucomana na acetilada nas posições seis, dos resíduos de manose. (20).

Em 1980, Barreto-Bergter et alii (21) isolaram polissacarídeos da parede celular de várias espécies de Aspergillus, compostos estes que haviam sido sintetizados em diferentes condições fisiológicas. No estudo das estruturas destes po

límeros foram empregadas análise de metilação-fragmentação e ressonâncias do próton e carbono¹³. Todos os polissacarídeos obtidos eram constituídos por manose, glucose e galactose.

Resultados de estudos feitos em 1981, por Hranisavlejevic-Iakovlejevic(22) estabeleceram para o polissacarídeo extraído de Aloe arborencens Mill uma estrutura formada por β -D-glucoses e ácido D-glucurônico ligados em 1 \longrightarrow 3 e 1 \longrightarrow 4. Foi indicada, por meio de espectros na região do infravermelho e medida da rotação ótica, a configuração β para a maioria das ligações glicosídicas no polissacarídeo estudado.

Wilkinson, em 1981, isolou da parede celular de Pseudomona diminuta(23) um polissacarídeo formado por manopiranoses acetiladas. Baseado em análises por RMP e RMC¹³ o autor propôs uma unidade repetitiva com a seguinte estrutura:



Bociek et alii em 1981(24) estudaram as gomas guar e locusta de várias procedências comerciais empregando exclusivamente a R M C¹³. Segundo os autores, a análise foi capaz de diferenciar efetivamente a goma guar da locusta bem

como de outros polissacarídeos usados normalmente como espessantes em alimentos. A rapidez do método foi uma vantagem adicional assinalada pelos autores neste estudo.

Cherniak et alii isolaram em 1982(25), da parede celular da levedura Cryptococcus neoformans um polissacarídeo que os autores identificaram como sendo formado por galactose, xilose, ácido glucurônico e manose na proporção molar de 1,9: 1,0 : 0,2 : 1,8 . A precipitação do polissacarídeo com concanavalina indicou a presença de α -D-manose terminal não redutora no polímero. Os autores elucidaram parcialmente a estrutura, através da degradação de Smith, definindo as ligações entre as manoses como sendo do tipo 1 \rightarrow 3 e entre as xiloses e resíduos glucurônicos como sendo do tipo 1 \rightarrow 2.

Yamada et alii(26) isolaram da parede celular de Absidia cylindrospora um polissacarídeo que foi identificado como uma α -D-manana com ligações 1 \rightarrow 2 e 1 \rightarrow 6 entre as manoses. Nas determinações da estrutura química, foram utilizadas a cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa e a ressonância magnética de carbono¹³.

Gorin e Mazurek, em 1982, (27) publicaram uma revisão sobre análises por ressonância magnética de carbono¹³ em polissacarídeos superficiais de leveduras. Os polímeros estudados apresentavam a cadeia principal formada por D-galacto

ses e D-manoses ligadas em 1→6. No trabalho foram discutidos e calculados os valores de delta para cada tipo possível de interação e os tempos de relaxação para as estruturas poliméricas permitidas.

Figueiredo, em 1983 (28), extraiu e identificou um polissacarídeo de Prosopis juliflora D.C. Os resultados das análises basearam-se na separação por cromatografias em papel e gasosa do polissacarídeo hidrolisado. O autor estabeleceu a relação molar de 4,2 : 1, entre manose e galactose na estrutura do polissacarídeo.

Em 1983, Radjabi et alii (29) determinaram as estruturas de dois polissacarídeos em Aloe vahombe. O polissacarídeo A, obtido em maior proporção, foi analisado por cromatografia em papel, cromatografia gasosa, espectroscopia infravermelha e metilação exaustiva. Os autores estabeleceram para o polímero A a estrutura de uma β-D-glucomanana acetilada, com a relação entre manose e glucose de 3 : 1. Os autores não fazem referências a estrutura da fração B.

3. MATERIAL

3.1 - Aloe africana (folhas).

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi colhida de plantas cultivadas na Fazenda Santa Eliza, Campinas, SP, em Setembro de 1982.

3.2 - Reagentes

O etanol absoluto usado em todas as experiências foi um produto comercial 99,5% G.L.. Os açúcares usados como padrões foram produtos pró-análise da marca Merck. Os polióis (treitol e eritritol) e os aldeídos (glicolaldeído e gliceraldeído) utilizados na identificação dos produtos de hidrólise do polissacarídeo oxidado e reduzido eram da marca Sigma. Os demais reagentes utilizados eram pró-análise e de diferentes procedências: Sigma, Carlo Erba, Fischer e Merck.

3.3 - Aparelhos

Os aparelhos utilizados neste trabalho foram:

- . Liofilizador VIRTIS 10 - 146 MR-BA
- . Centrífuga SORVALL R C 2 B
- . Centrífuga internacional L, modelo K

- . Viscosímetro BROOKFIELD ENG LVT
- . Banho termostatzado com agitador rotatório B.BRAUN MEL
SUGEN
- . Polarímetro fotoelétrico CARL ZEISS
- . Estufa FANEM, modelo 320 - 1
- . Potenciometro METROHN HERISAL E 512 com microeletrodo com
binado
- . Balança METLER modelo H-34
- . Microdensitometro CANALGO, modelo G equipado com computa-
dor CANALGO, modelo C.
- . Espectrofotometro de absorção do infravermelho PYE-UNICAM
SP 1000
- . Espectrofotometro de absorção UV-Visível PYE-UNICAM SP
8000
- . Cromatografo a gás VARIAN AEROGRAPH 2400 acoplado a gera-
dor de hidrogênio (coluna empacotada com 3% de ECNSS-M em
Chrom Q)
- . Cromatografo a gás acoplado a espectrometro de massa FIN-
NIGAM 4000 com computador INCOS 2300 DATA SYSTEM. (coluna
capilar de vidro contendo mistura de OV-17 e OV-225)
- . Espectrometro VARIAN - WCV - XLFT 100 - 15 (25,2 MHz)

4. MÉTODOS E RESULTADOS

4.1 - Métodos de análise

4.1-1 Umidade e cinzas

Umidade e cinzas foram determinadas pelos métodos da A.O.A.C. (30), números 31 005 e 31 012, respectivamente.

4.1-2 Prova de Fehling

A reação de Fehling foi efetuada segundo o procedimento descrito por Litwach (31)

4.1-3 Prova para presença de amido

A presença de amido foi demonstrada pela reação com iodeto de potássio e iodo, segundo método de McCready e Hassid (32).

4.1-4 Prova para grupos acetílicos

As quantidades percentuais de grupos $O-COCH_3$ foram estabelecidas pela reação com hidroxilamina em perclorato, segundo método de McComb e McCready (33). Para as determinações foi usada uma curva-padrão de glucose peracetilada.

4.1-5 Determinação dos carboidratos

Os açúcares redutores livres foram determinados, com cobre em meio alcalino, pelo método de Somogy-Nelson(34) e os resultados calculados em função de curva-padrão de glucose ..

Os açúcares totais foram quantificados pelo método clássico de Dubois modificado por Previato(35), fazendo-se reagir 50 μ L de uma solução aquosa 0,1% da amostra aos quais foram juntados 50 μ L de uma solução de fenol a 80% e 1,5 mL de ácido sulfúrico e aquecendo-se por 10 minutos em banho-maria.

4.1-6 Prova para ácidos urônicos

A prova para ácidos urônicos foi efetuada por reação com carbazol e ácido sulfúrico, segundo técnica de Galambos(36). A identificação do resíduo ácido foi feita pela reação com cisteína sulfúrica, com o método de Dische(37).

4.1-7 Determinação de proteínas

Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método de Micro-Kjeldal (38). As concentrações de proteínas foram determinadas por reação com o corante Coomassie Brilliant Blue

(CBB), segundo método de Bradford(39). Os resultados foram calculados em função de curva padrão da albumina desoro bovino.

4.2 Extração da goma bruta da Aloe africana

A metodologia usada para obtenção dos polissacarídeos no presente trabalho está mostrada na figura 1.

Oito quilos de folhas cortadas, moídas e escaldadas durante 20 minutos foram filtradas através de pano e prensadas. Foram recuperados 2 Kg de resíduo e 4,15 Kg de suco viscoso.

O suco (4 Kg) foi centrifugado a 16 000 rpm por 40 minutos a 4°C, o sobrenadante clarificado foi separado, concentrado na temperatura de 45°C sob pressão reduzida até um volume aproximadamente de 1500 mL e adicionado com agitação a 3 volumes de etanol gelado e acidificado com HCl até pH 2.

A mistura foi deixada em repouso por 24 horas e depois centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm. O precipitado sedimentado (II) foi separado, lavado 3 vezes com etanol absoluto, 2 vezes com acetona e sêco em estufa a vácuo por 24 horas a 60°C.

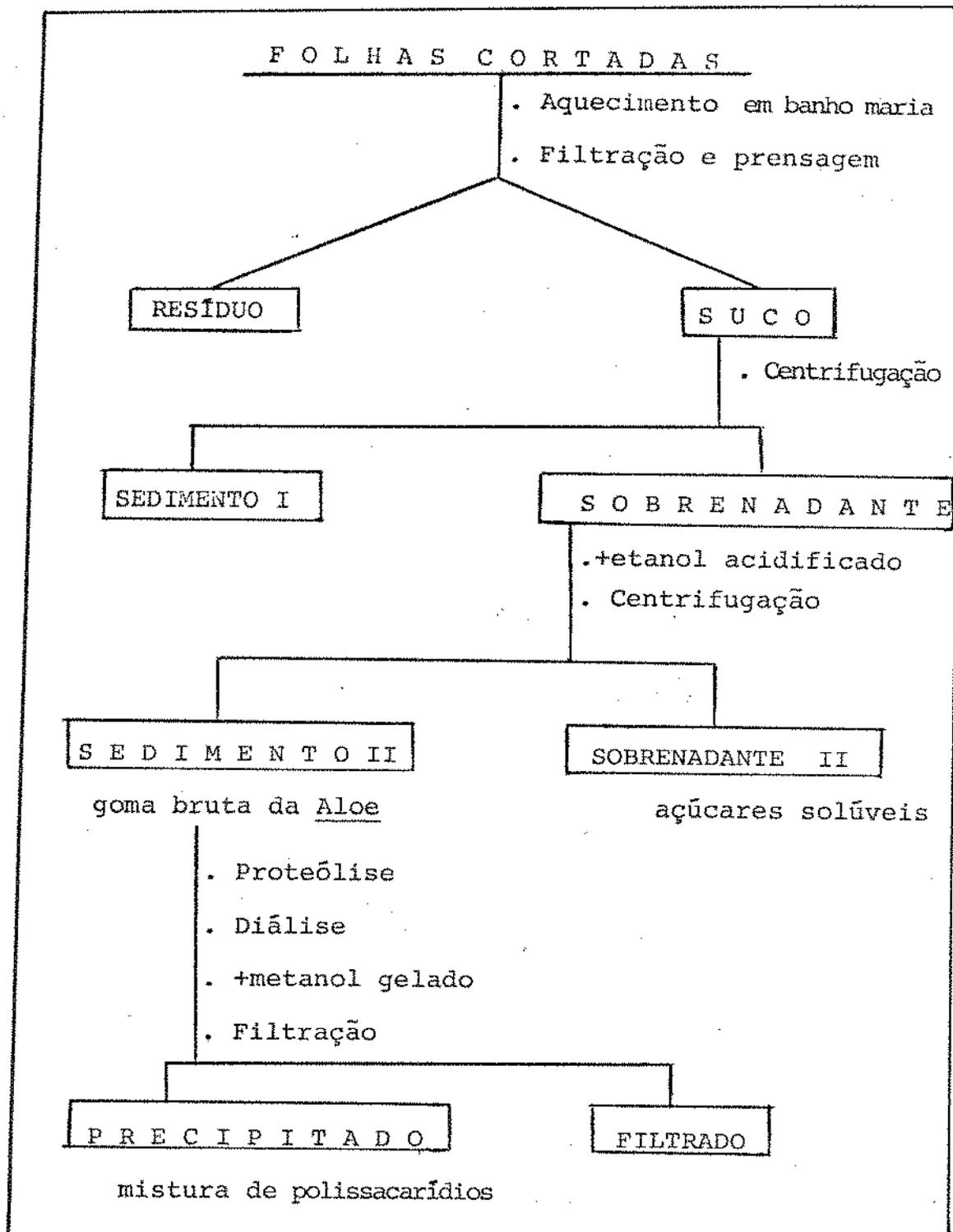


Figura 2 - Esquema de extração e purificação dos polissacarídios da Aloe africana.

No material obtido (0,24 Kg) foram feitas análises para açúcares livres, amido, proteína além de dosagens quantitativas dos teores de nitrogênio total, proteína, umidade, cinza, íons de cálcio e carboidratos totais com os seguintes resultados:

açúcares livres	:	(-)
proteína	:	(+)
amido	:	(-)
carboidratos totais	:	65,0 %
proteína	:	6,5 %
umidade	:	2,32%
cinza	:	2,00%
Ca ⁺⁺	:	1,2 %
nitrogênio total	:	1,08 g N / 100 g amostra.

Após estas análises ficou determinado o produto obtido como sendo uma goma bruta.

No sobrenadante II, da precipitação da goma bruta, depois de concentração do volume até 50 mL sob pressão reduzida, foram feitas provas para açúcares redutores e identificação por cromatografia em papel Whatman nº 1, com aplicação de 50 μ L em cada mancha inicial. Como solvente foi empregado n-butanol, piridina e ácido clorídrico 0,1N nas proporções 5:3:2 v/v (40). A revelação foi feita com solução alcalina de nitrato de prata (41) e como padrões foram usados xilose, arabinose, glucose, galactose, manose, ramnose, frutose, lactose, celobiose e maltose.

Por comparação do R_G do composto isolado com o R_G dos açúcares padrão, foi identificada a glucose como o monossacarárdio solúvel da Aloe africana.

4.3 Proteólise da goma bruta da Aloe africana

Vinte gramas da goma bruta isolada em 4.2 foram adicionadas, com agitação, a 400 mL de uma solução de tripsina 0,1% em tampão fosfato. A solução obtida foi deixada por 15 horas em banho termostaticado a 40°C, sendo em seguida aquecida por 20 minutos em banho-maria em ebulição, neutralizada e dialisada contra água destilada a 5°C por 2 dias.

A mistura dialisada foi evaporada até um volume de 100 mL, resfriada a 5°C e adicionada a 3 volumes de metanol gelado. O precipitado obtido foi filtrado, lavado com etanol gelado e seco em estufa a vácuo por 24 horas.

No material obtido, foram determinados carboidratos totais e proteínas com os seguintes resultados:

Proteínas	0,2%
Carboidratos totais	: 72,5%

Este material foi dissolvido em água, reprecipitado com metanol, dialisado por 10 dias contra água destilada a 4°C e liofilizado. No produto liofilizado (12,5 g) foram feitas determinações qualitativas para ácidos urônicos e açúcares livres e calculados os teores de grupos O-acetílicos, proteína, carboidratos totais e ácidos urônicos com os seguintes resultados:

Fehling	: (-)
Carboidratos totais	: 96%
Ácidos urônicos	: 24%
Grupos O-acetílicos	: 4%
Proteína	: 0,12%

Os resultados indicaram que o produto isolado em 4.3 era uma mistura pura em polissacarídios (MP) parcialmente O-a cetilada.

4.3-1 Eletroforese da mistura de polissacarídios obtida em 4.3.

Aproximadamente 20 μ L de uma solução a 0,1% foram aplicados em lâmina de gel de agarose de 7,5 x 5,0 x 0,2 cm e desenvolvidas submersas em tampão ACOR:DAP 0,05M em pH 9 e 5°C, de acordo com o método descrito por Mourão et alii (42)

Após migração eletroforética durante 50 minutos, os polissacarídios foram precipitados com solução a 0,1% de cetavlon durante 15 horas. As lamínas foram secas, a seguir, à temperatura ambiente e tratadas durante 20 minutos com solução aquosa 0,1% de azul de toluidina em ácido acético 1%. Como padrão de migração foi utilizado o vermelho de cresol e mucopolissacarídios com pesos moleculares variando de 20.000 a 80.000 daltons.

Os resultados da microeletroforese indicaram a presença de 3 polissacarídios na mistura da Aloe africana, com peso molecular na faixa de 65 000 \pm 5 000 daltons.

4.3-2 Determinação da viscosidade das soluções de MP, obtida em 4.3.

Foram determinadas as viscosidades das soluções aquosas a 0,5% da amostra, em três diferentes pH, com variação de tempo e força de cisalhamento.

Foi usado nas experiências o cilindro de rotação LVI. Como padrão de comparação foi empregada uma solução de pectina cítrica a 0,5% em água nas análises. Foi retirada, de um trabalho de Meer et alii(43), a viscosidade do amido.

Na tabela 1 encontram-se as viscosidades das soluções da mistura de polissacarídeos (MP), com as soluções de pectina e de amido, num tempo de análise de 30 segundos a 25°C. Quando se aumentou o tempo de análise não houve variação na viscosidade aparente das 4 soluções estudadas.

T A B E L A 1 - Viscosidade de soluções 0,5% dos polissacarídios da A.africana, da pectina e do amido.

HIDROCOLÓIDES	CPS/ VISCOSIDADE APARENTE				
	6 rpm	12 rpm	30 rpm	50 rpm	60 rpm
MP ^(a) pH 4	8000	6250	955	402	87
MP pH 7	10000	8000	865	89	44
MP pH 13	6500	4000	438	63	24
Pectina pH 4	9000	7250	1675	402	73
Amido ^(b)				100	

(a) MP = mistura de polissacarídios da A.africana

(b) valor retirado de Meer et alii(43)

4.3-3 Hidrólise total da mistura de polissacarídeos obtida em 4.3

De uma solução 0,1% da mistura de polissacarídeos obtida em 4.3, foi retirada uma amostra (2 mL), a qual foram adicionados 2 mL de ácido TFA 3M e a mistura foi aquecida por 2 horas e 30 minutos em banho-maria em ebulição. Após, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e os produtos de hidrólise foram analisados por cromatografia em papel.

4.3.3-1 Identificação por cromatografia descendente em papel dos açúcares obtidos na hidrólise total da mistura de polissacarídeos.

Os monossacarídeos obtidos na hidrólise total da MP foram identificados por cromatografia descendente em papel Whatman nº 1, durante 6 horas.

O resíduo da hidrólise, obtido em 4.3-3 foi adicionado com 0,2 mL de mistura etanol:água (1:2 v/v). Aproximadamente 20 μ L da solução obtida foram aplicados em cada mancha inicial.

Os reveladores usados foram solução alcalina de nitrato de prata e solução de p-anisidina e ácido ftálico(41). Como padrões foram usados os mesmos açúcares citados no item 4.2 (página 20) e ainda ácidos galacturônico e glucurônico.

Foram utilizados os seguintes sistemas de solventes:

SISTEMA I : n-butanol:piridina: HCl 0,1N 5:3:2 (40)

SISTEMA II : acetato de etila:piridina:água 8:2:1 (44)

SISTEMA III : amônia: ácido isobutírico 3:5 (45)

Por comparação dos valores de R_G , dos monômeros hidrolisados com os açúcares padrão, foram identificados galactose, glucose, manose, ácido galacturônico e arabinose como os açúcares constituintes dos polissacarídios da Aloe africana.

4.4 Separação dos polissacarídios da mistura de polímeros isolada em 4.3

Uma solução (700 mL) contendo 3,5 g da mistura de polissacarídios foi tratada com cetavlon de acordo com o método descrito por Loyd et alii(46). O precipitado obtido (0,175g) foi separado por filtração. O filtrado foi dialisado a 5°C contra água destilada por 5 dias e o volume do dialisado foi concentrado a pressão reduzida aproximadamente a 50 mL e liofilizado.

Uma solução (200 mL) contendo 2,5g deste material liofilizado foi levada a pH 10 com amônia diluída e a mistura foi aquecida até 50°C. A esta solução foram adicionados, sob

agitação, 20 mL de uma solução aquosa 2,5% de cloreto de cálcio. A mistura após voltar lentamente à temperatura ambiente foi deixada a 5°C por 15 horas e finalmente centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm.

O sedimento da centrifugação foi disperso em água, a dispersão neutralizada pela adição de HCL 2N e dialisada a 5°C por 10 dias contra água destilada. Após redução de volume até 50 mL, a solução foi liofilisada sendo obtidos 0,25g de um polímero denominado polissacarídeo A.

O sobrenadante foi neutralizado com HCL, dialisado contra água destilada, evaporado sob pressão reduzida e finalmente liofilisado. Foram obtidos 2,25g de um material que foi denominado polissacarídeo B.

4.5- Análises das estruturas dos polissacarídeos A e B.

As eletroforeses em gel de agarose dos polissacarídeos A e B foram feitas no esquema descrito em 4.3-1. Esta análise mostrou uma única mancha para cada um dos polissacarídeos analisados, na faixa de peso molecular de $65\ 000 \pm 5000$ daltons.

Nos polissacarídios A e B foi feita reação de Fehling com resultados negativos. As determinações quantitativas para carboidratos totais indicaram que os polissacarídios encontravam-se puros. As concentrações de íons cálcio, analisados por espectrofotometria de chama, estabeleceram proporções menores do que 0,1%.

4.5-1 Hidrólise total dos polissacarídios A e B

De uma solução 0,1% do polissacarídio A, obtido em 4.4 , foi retirada uma amostra (2 mL) a qual foram adicionados 2 mL de ácido TFA. A solução foi aquecida por 2 horas e 30 minutos em banho-maria. Após este tempo, o solvente foi evaporado à pressão reduzida e os produtos obtidos submetidos a cromatografia em papel.

O polissacarídio B foi hidrolisado com o mesmo procedimento e nas mesmas quantidades aplicados ao polissacarídio A. Os produtos de hidrólise foram analisados por cromatografia em papel e cromatografia gasosa.

4.5.1-1 Identificação por cromatografia em papel dos produtos de hidrólise dos polissacarídeos A e B.

Os produtos de hidrólise dos polissacarídeos A e B foram submetidos a cromatografia em papel nas condições descritas em 4.3.3-1 (página 25).

Na identificação do polissacarídeo A foi utilizado apenas o sistema de solventes III. A revelação foi feita com solução de p-anisidina e ácido ftálico. Como padrões foram empregados os açúcares neutros constituintes da mistura de polissacarídeos e ainda ácidos galacturônico e glucurônico. Por este método foi identificado o ácido galacturônico como o monossacarídeo constituinte do polissacarídeo A.

Na cromatografia em papel do polissacarídeo B hidrolisado foram usados os sistemas I e II. Como padrões os mesmos açúcares usados nas cromatografias em papel do polissacarídeo A. Após tratamento do cromatograma, com solução alcalina de nitrato de prata, foram observados ácido galacturônico, manose, glucose, galactose e arabinose como os monossacarídeos constituintes do biopolímero B.

4.5.1-2 Preparação dos alditois O-acetilados dos produtos de hidrólise do polissacarídeo B.

Após hidrólise total com ácido TFA 3M, conforme descrito no item 4.5.1, foram preparados os derivados alditois O-acetilados segundo Previato e Mendonça-Previato(47). Uma amostra do polissacarídeo B (0,1 mg) foi hidrolisada e a seguir reduzida com 10,0 mg de hidreto de boro e sódio em 2 mL de NH_4OH 0,5 M por 1 hora na temperatura ambiente. O excesso do hidreto foi destruído pela adição de ácido acético 20% até pH neutro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida a 35°C. O borato foi removido, por co-destilação a vácuo, com 3 porções (2 mL) de metanol a 35°C.

Os alditois obtidos foram O-acetilados com 5 mL de anidrido acético e piridina (1:1 v/v) a 100°C por 1 hora. A reação foi adicionada com 20 mL de água e os alditois O-acetilados foram extraídos com 5 porções de clorofórmico(2 mL). As soluções orgânicas foram juntadas, lavadas com 3 porções de água (2 mL) e adicionadas com sulfato de sódio.

Os derivados alditois O-acetilados, recuperados após filtração e evaporação total a vácuo do filtrado, foram identificados em cromatografia gasosa.

4.5.1.2-1 Identificação e dosagem por cromatografia gasosa dos derivados obtidos em 4.5.1-2

Os derivados dos açúcares foram dissolvidos em 50 μ L de diclorometano e submetidos à cromatografia gasosa nas seguintes condições:

Coluna empacotada com 3% de E C N S S - M em Chrom Q, como gás de arraste nitrogênio com vazão de 30 mL por minuto e vazões de hidrogênio e ar de 30 mL /min e 300 mL/min, respectivamente. A temperatura inicial de 120°C foi aumentada de 2°C por minuto até uma temperatura de 200°C, As temperaturas do detector e injetor foram, respectivamente, 280°C e 210°C.

A atenuação inicial de 8X foi aumentada para 64X após 22 minutos de análise. A identificação dos compostos foi feita por comparação dos tempos de retenção e por co-injeção com padrões. A quantidade relativa dos açúcares foi determinada segundo Sawardeker et alii(48). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 2.

A figura 3 mostra o cromatograma obtido.

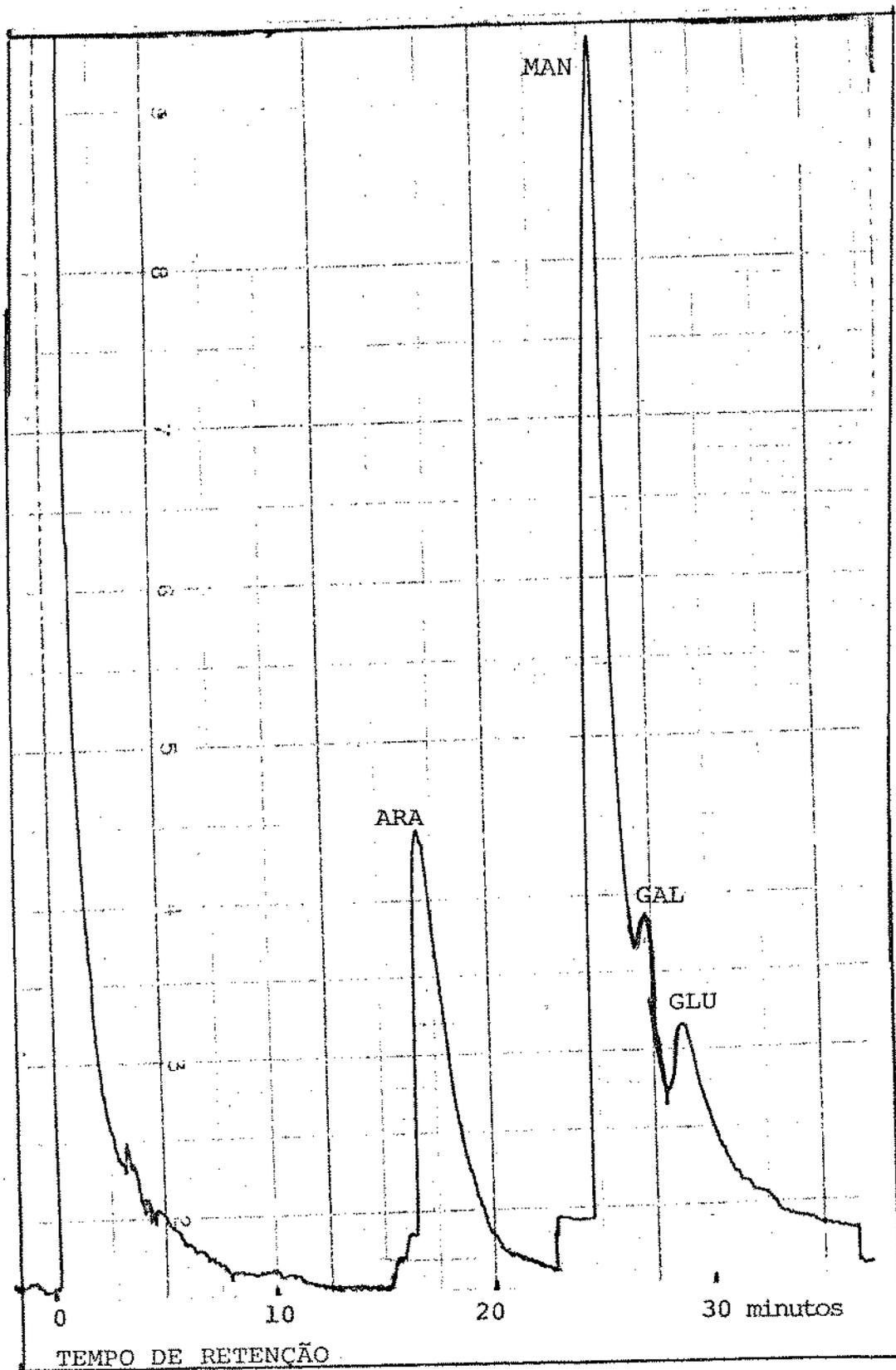


FIGURA 3 - Cromatograma dos alditois O-acetilados dos produtos de hidrólise do polissacarídeo B.

4.5-2 Desvio do sentido do plano da luz polarizada dos polissacarídeos A e B.

Para a verificação do sentido da luz polarizada foram feitas soluções aquosas a 0,1% dos polissacarídeos A e B, que foram colocadas em tubos de polarímetro de 2 mL de capacidade e 5 cm de comprimento.

As medidas de $[\alpha]$ encontram-se na tabela 2

Tabela 2 - Resultados de análises dos polissacarídeos A e B da Aloe africana.

POLIMERO	$[\alpha]$	ÁCIDO URÔNICO %	ACETILA %	AÇUCARES ^(a)				
				Man	Gal	Glu	Ara	Gala
A	+125	84,2	15,4					1
B	- 90	9,4	6,0	13	6	6	2	3

(a) Relação calculada em cromatografia gasosa.

4.5-3 Hidrólise gradativa do polissacarídeo B

A 20 mg do polissacarídeo B liofilizado foram adicionados 20 mL de ácido clorídrico 0,5N e a mistura foi deixada em banho-maria por 3 horas. Foram retiradas amostras da mistura em intervalos de tempos variados. As alíquotas separadas foram cromatografadas em papel com os três sistemas de solventes citados em 4.3.3-1.

Foram verificadas as presenças de manose e arabinose depois de 10 minutos. Após meia hora de hidrólise houve o aparecimento de galactose e a glucose só foi observada com 90 minutos de reação. A mancha com R_G semelhante ao ácido galacturônico foi revelada na amostra com 20 minutos de reação.

4.5-4 Oxidação do polissacarídeo B com meta-periodato de sódio

Uma solução aquosa (0,2 mL) a 2% do polissacarídeo B foi tratada com meta-periodato de sódio 0,4 M (0,2 mL) a 59°C durante 25 dias (49). O excesso do periodato foi decomposto pela adição de etilenoglicol com posterior diálise contra água destilada por 3 dias a 59°C. A solução dialisada foi concentrada a vácuo e o resíduo tratado com 20 mg de hidreto de boro e sódio em 4 mL de amônia diluída (35). A mistura foi deixada durante 24 horas a temperatura ambiente e

neutralizada com ácido acético diluído. Após diálise por 10 dias contra água destilada a 5°C, o solvente foi evaporado totalmente, a vácuo, e o resíduo hidrolisado com ácido TFA 0,1M por 5 horas a 100°C.

Os produtos da hidrólise, recuperados por evaporação total do solvente, foram identificados em cromatografia descendente em papel e camada delgada.

4.5.4-1 Identificação e dosagem dos produtos obtidos em 4.5-4 por cromatografia em papel

A identificação dos produtos de hidrólise foi feita por cromatografia em papel, tendo como solvente o sistema II. Como padrões foram usados eritritol, treitol, glicerol, glicol, glicolaldeído e gliceraldeído.

Os compostos foram estimados por microdensitometria segundo Mourão et alii(50), e apresentaram os seguintes percentuais:

gliceraldeído (2%), glicerol (4%), manose (9%), galactose (17%), eritritol (32%) e glicolaldeído (36%).

4.5.4-2 Identificação, por cromatografia em camada delgada, dos produtos de hidrólise obtidos em 4.5-4.

Vinte microlitros de solução 0,1% de amostra foram aplicados em placas de sílica gel preparadas de acordo com o procedimento descrito por Kremer(51). A mistura de benzeno , etanol, amônia e água nas proporções de 100:24:1:7(52) foi usada como solvente na cromatografia. A revelação foi feita com solução alcoólica de 2,4 dinitrofenilidrazina(41) . Foram usados como padrões: formaldeído, glicocaldeído e gliceraldeído.

Foram identificados glicocaldeído e gliceraldeído.

4.5-5 Determinação da velocidade de oxidação do polissacarídeo B.

Uma solução aquosa do polissacarídeo B foi tratada com uma solução aquosa de meta-periodato de sódio, em quantidades tais que a concentração final obtida fosse a 0,1% em relação ao polímero e 0,4M em relação ao periodato(53). Esta solução foi deixada a 25°C durante 8 dias tendo sido tiradas alíquotas em intervalos de tempos variados.

Nestas amostras foram determinados o teor de ácido fórmico liberado(54) e a quantidade de oxidante consumido(55). Como controle foi empregado uma solução de periodato 0,4M em água. Na tabela 3 encontra-se a velocidade da oxidação com periodato, em relação a 30 moles de hexoses anidras.

Tabela 3 - Resultados da oxidação por unidade básica do polissacarídeo B da A africana.

HORAS DE REAÇÃO	M O L E S	
	HCOOH LIBERADO	IO ₄ ⁻ CONSUMIDO
24	1,50	10,6
48	1,60	17,0
72		17,8
96	1,90	18,0
144	1,90	18,3
168		18,3

HCOOH = ácido fórmico

IO₄⁻ = Periodato

4.5-6 Metilação do polissacarídeo B.

O polissacarídeo B foi metilado, de acordo com os métodos descritos por Hirst e Percival(56) e modificados por Gorin(57), do seguinte modo: 10 mg do polissacarídeo B foram dissolvidos em 60 mL de solução de NaOH (20 g de alcali para 60 mL de água). A esta solução foram adicionados, de 20 em 20 minutos, dois mL de sulfato de dimetila. Após a adição dos 18 mL iniciais, a solução foi resfriada, adicionada com mais 60 mL de NaOH e re-adicionada com sulfato de dimetila por mais 3 horas. A seguir, a reação foi neutralizada com ácido acético diluído e dialisada por 3 dias contra água destilada, após o que, o solvente foi totalmente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em dimetilformamida(20 mL) e a esta solução foram adicionados 4 mL de iodeto de metila e 2 g de óxido de prata. A mistura foi deixada sob agitação na temperatura ambiente durante 15 horas.

Diariamente, as adições de óxido de prata e iodeto de metila foram repetidas por mais 3 dias. Após esse tempo o produto da reação foi dissolvido em 2 mL de diclorometano, filtrado e a fração orgânica foi lavada 4 vezes (2 mL) com água.

O polissacarídeo B metilado foi obtido por evaporação total do solvente, sob pressão reduzida.

4.5-7 Hidrólise total e redução do polissacarídeo B metilado, obtido em 4.5-6.

Uma amostra de 10 mg do polissacarídeo B metilado foi dissolvida em solução 90% de ácido fórmico (2 mL) e aquecida a 100°C em banho-maria por 1 hora. Após evaporação a vácuo do solvente, o resíduo foi tratado com 5 mL de ácido sulfúrico 10% por 16 horas a 100°C, neutralizado com carbonato de bário e filtrado. O filtrado (sais de bário) foi lavado duas vezes com água e os filtrados combinados foram evaporados totalmente sob pressão reduzida.

Os açúcares parcialmente O-metilados obtidos foram reduzidos com hidreto de boro e sódio em amônia no esquema e proporções citados no item 4.5.1-2.

4.5-8 Acetilação dos derivados alditois O-metilados do polissacarídeo B.

Os alditois O-metilados (2 mg) foram O-acetilados com anidrido acético e piridina (1:1, 1 mL) a 100°C durante 1 hora, segundo técnica descrita por Jansson et alii (58). O excesso de reagente foi removido por co-destilação a vácuo com tolueno. O resíduo foi adicionado com 5 mL de CH_2Cl_2 e lavado com 3 porções (1 mL) de água.

Os derivados metil O-acetilados foram obtidos por evaporação total do solvente sob pressão reduzida a 35°C e identificados por CG-EM.

4.5.8-1 Identificação e dosagem por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa .

As cromatografias em CG-EM foram feitas segundo Gorin et alii(59) sendo repetidas a cada 2 seg., numa varredura entre 200 e 1200 m/z e nas seguintes condições:

Coluna capilar de vidro (0,25 mm X 30 m) contendo uma mistura de OV-17 e OV-225 1:3(60). Como gás de arraste foi empregado o hélio. A programação de temperatura consistiu num aumento de 40°C por minuto, na faixa de temperatura de 40°C até 270°C.

Os tempos de retenção foram ajustados ao derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil-1,5-di-O-acetil-manitol. Os compostos obtidos foram tentativamente identificados por seus tempos de retenção, fragmentação e pico molecular observados no espectro de massa por impacto de elétrons. Os compostos responsáveis pelos picos 2,4,5,6 e 7 também foram identificados por comparação com padrões.

A figura 4 , na página 42, mostra o cromatograma em CG-EM por impacto de elétrons. As figuras de números 5 até 12 mostram os espectros de massa dos derivados responsáveis pelos picos 1 até 8, respectivamente.

Na tabela 4 encontram-se os valores para os derivados metil-O-acetilados obtidos em 4.5-8. As intensidades relativas foram colocadas entre parênteses para cada fragmentação.

Tabela 4 - Valores de identificação dos derivados metil-O-acetilados dos produtos de hidrólise do polissacarídeo B da A. africana

PICO	O-metil-alcool	T _M	M ⁺	m/e (A.R.)
1	2,3,5 -arabinitol	0,55	103	43(100)-85(20)-72(12)
2	2,3,4,6-manitol	1,00	312	43(100)-101(61)-117(30)
3	2,3,4-gal A ^(a)	1,05	299	43(100)-74(97)-87(65,9)
4	2,3,6-manitol	1,35	322	43(100)-117(49)101(21)
5	2,3,6-glucitol	1,41	313	43(100)-117(48)-113(22)
6	2,3,4-galactitol	1,54	322	43(100)-117(38)-101(32)
7	2,4-galactitol	2,12	305	43(100)-117(58)-129(31)
8	3,4-galactitol	2,37	314	43(100)-117(62)-139(11)

(a) Derivado do ácido galacturônico.

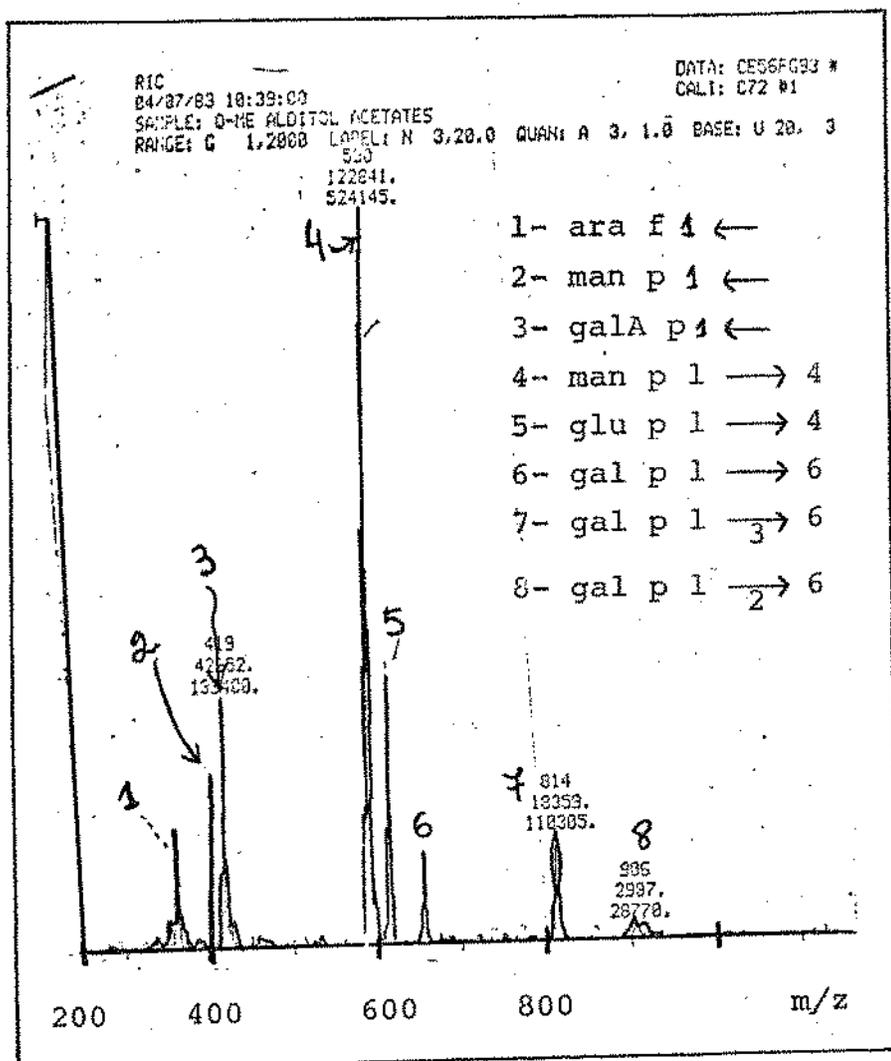


Figura 4 - Cromatograma dos derivados alditois O-acetila-
 dos do polissacarídeo B metilado, em CG-EM.

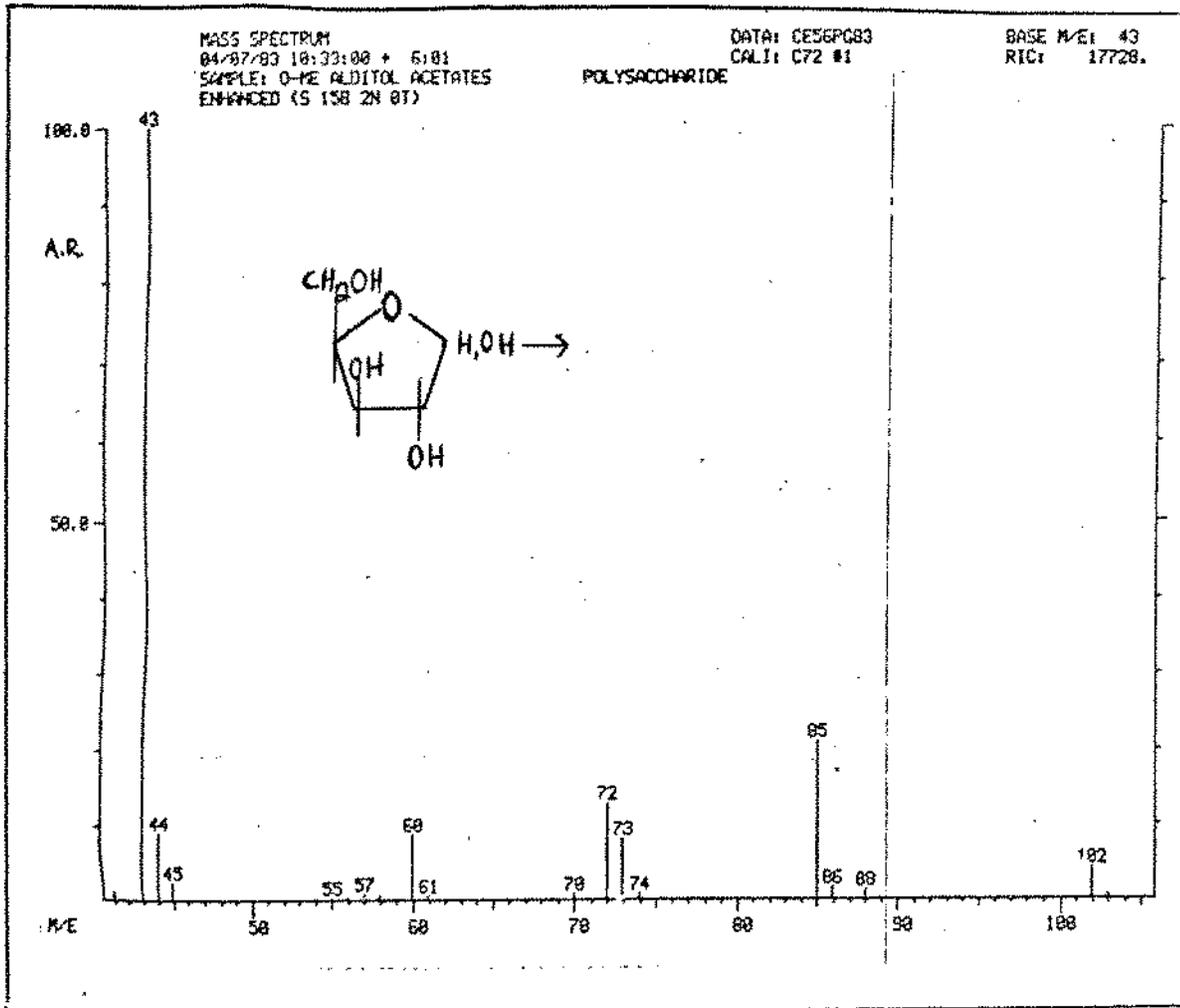


Figura 5 - Espectro de massa referente ao pico 1, em CG-EM.

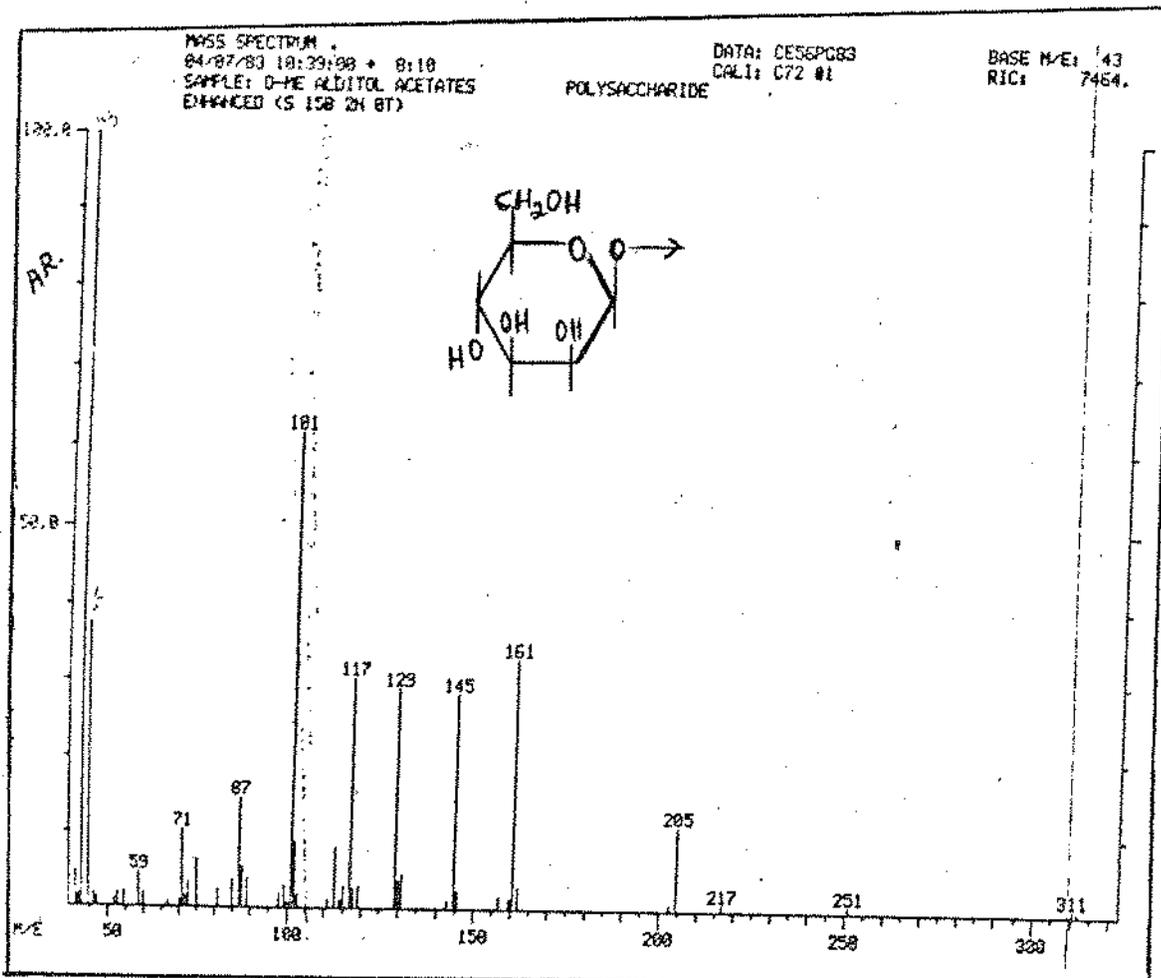


Figura 6 - Espectro de massa referente ao pico 2, em CG-EM

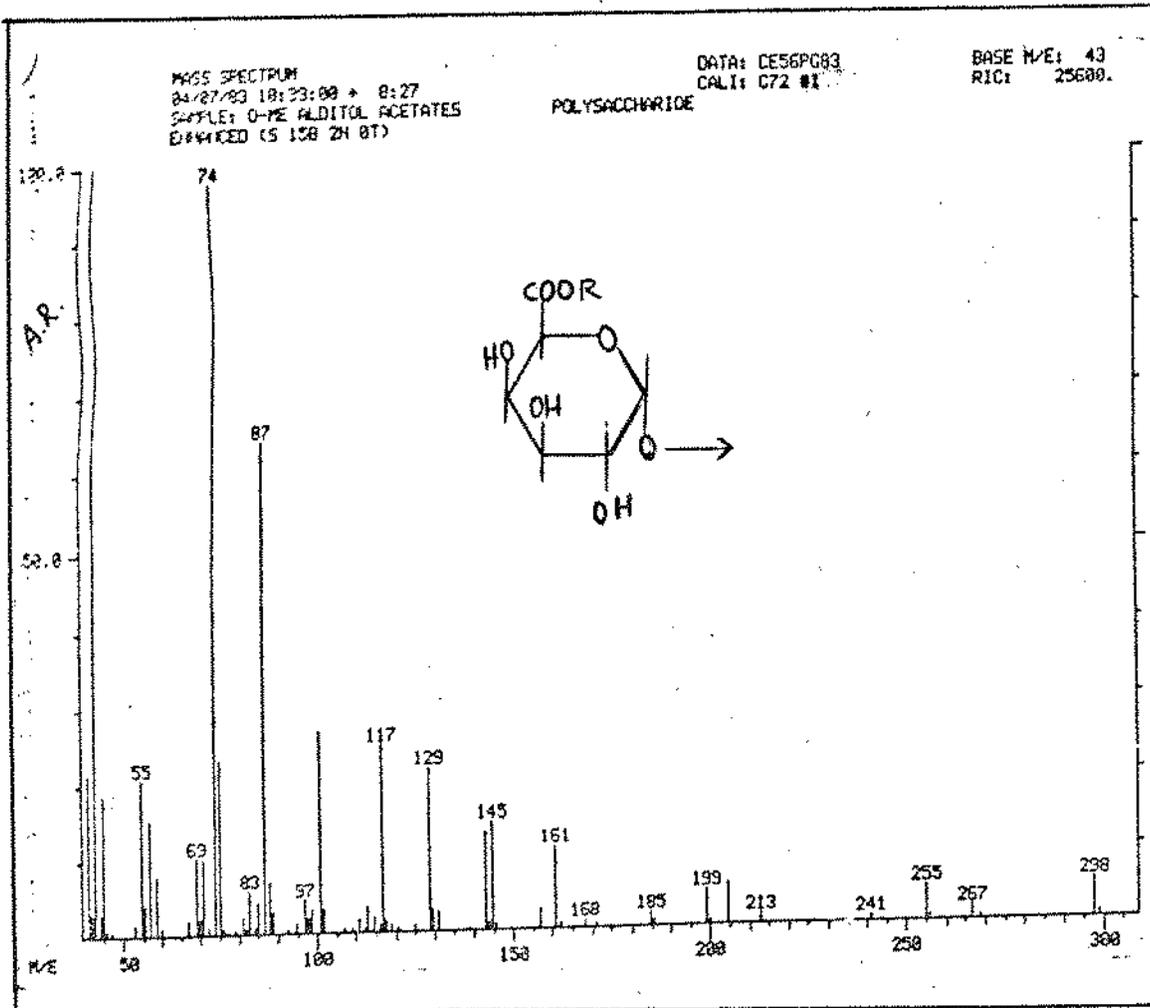


Figura 7 - Espectro de massa referente ao pico 3, em CG-EM

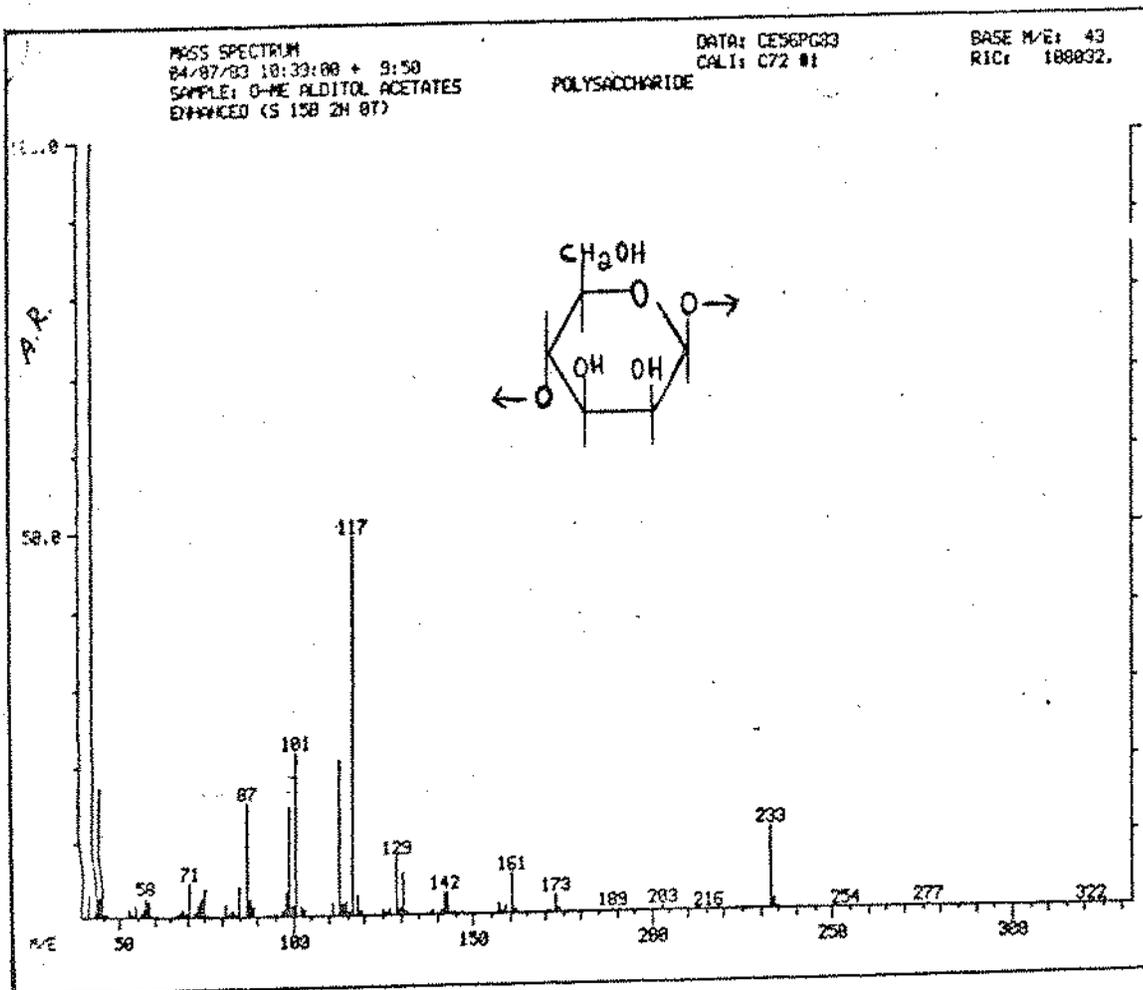


Figura 8 - Espectro de massa referente ao pico 4, em CG-EM.

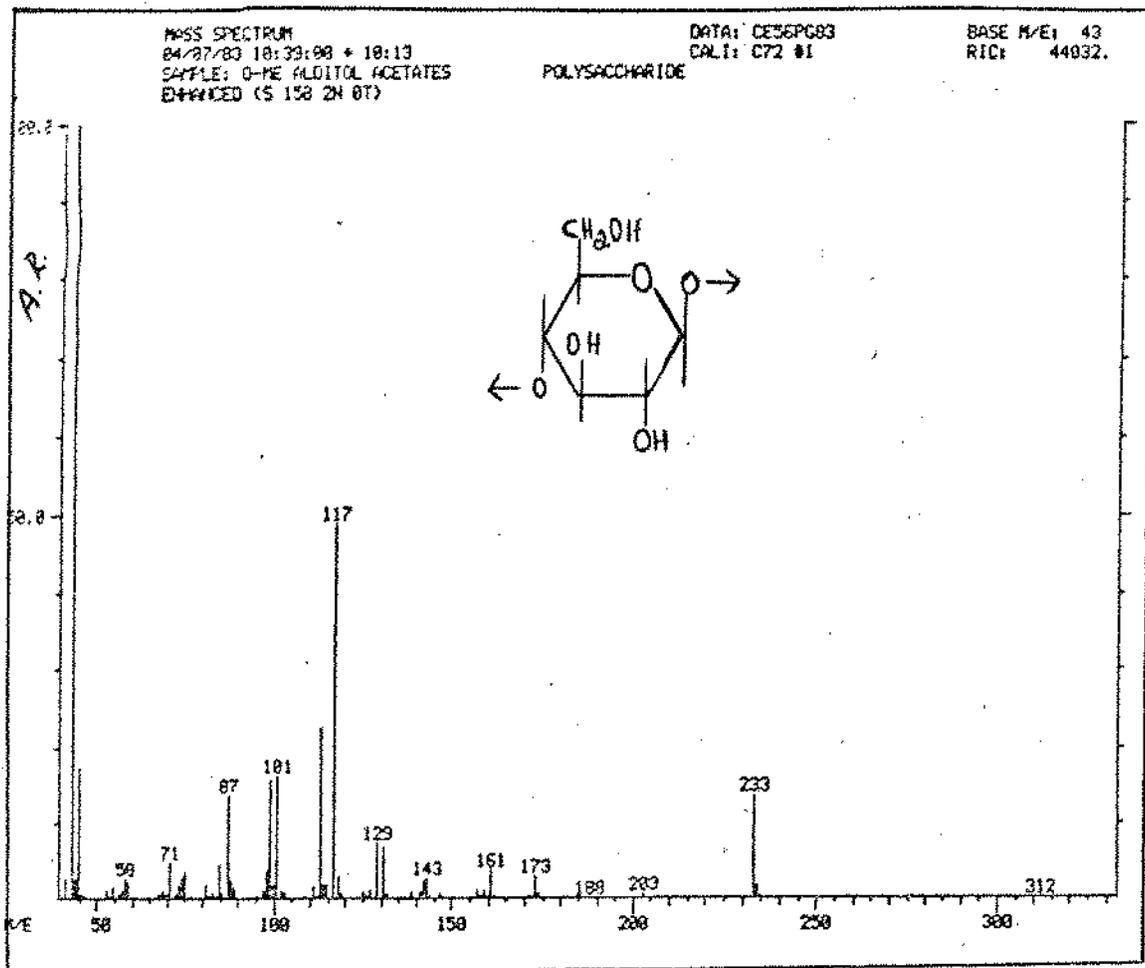


Figura 9 - Espectro de massa referente ao pico 5, em
 CG-EM

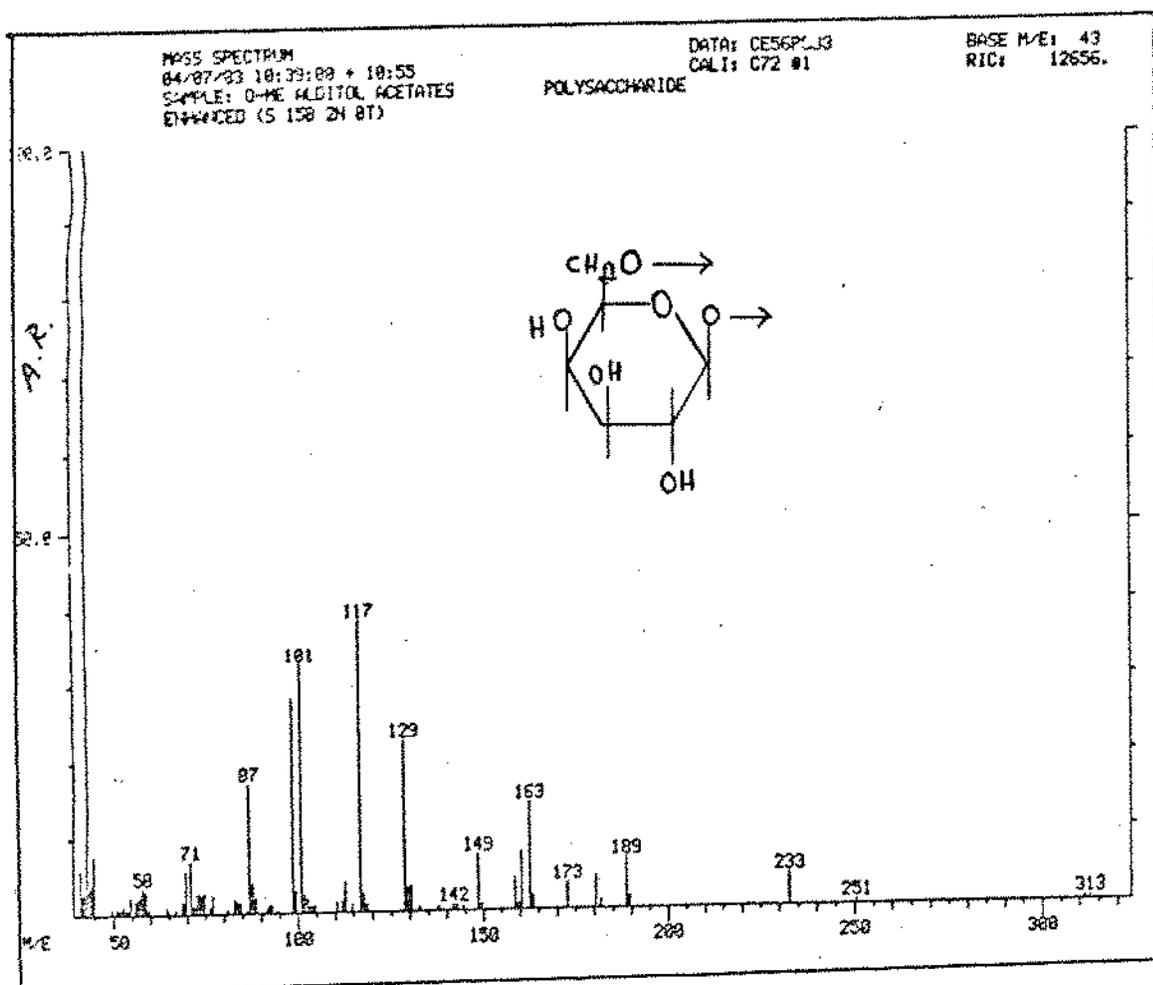


Figura 10 - Espectro de massa referente ao pico 6, em
 CG-EM.

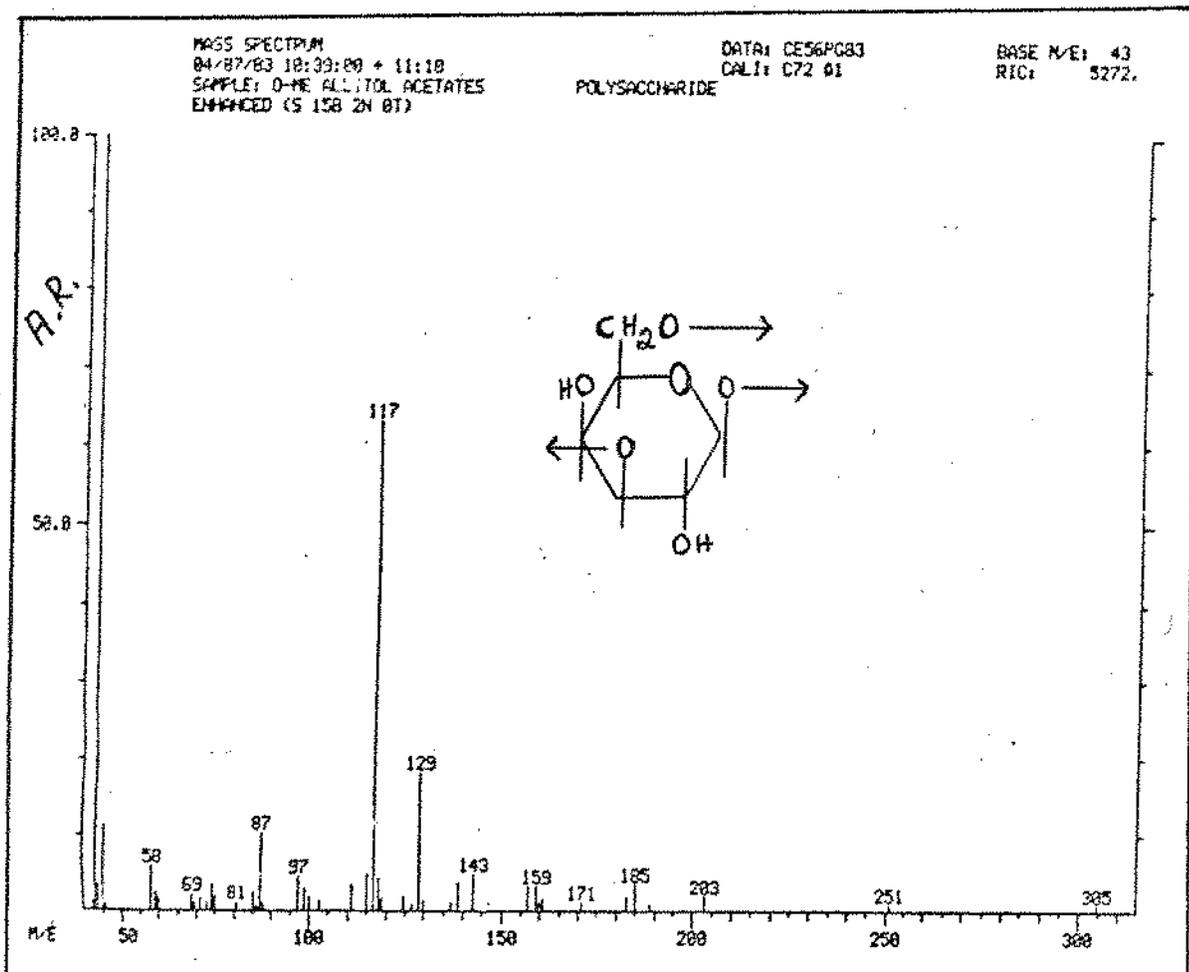


Figura 11 - Espectro de massa referente ao pico 7, em
 CG-EM.

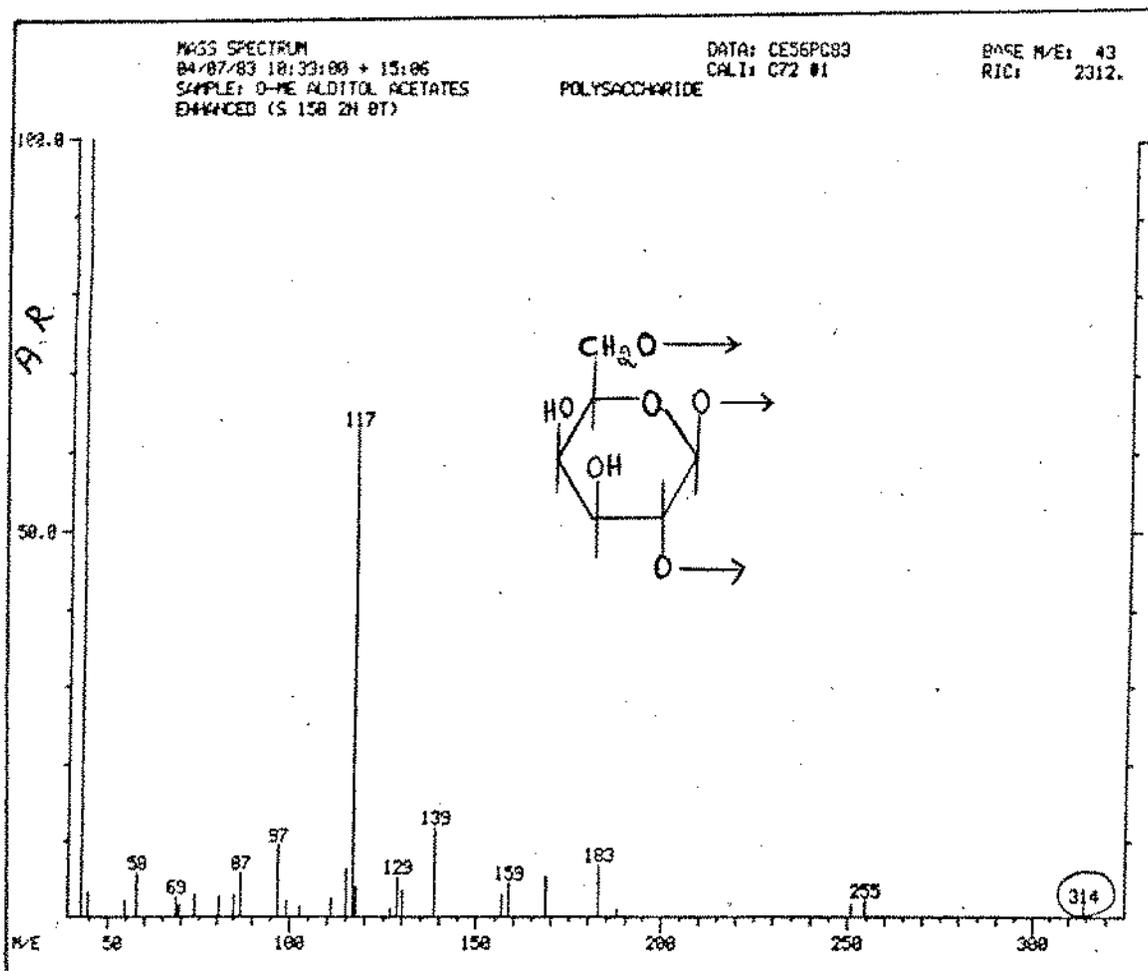


Figura 12 - Espectro de massa referente ao pico 8, em
 CG-EM

4.5-9 Espectroscopia infravermelha dos polissacarídios A e B.

Os espectros foram feitos em dispersão do material em nujol em células de NaCl. O aparelho foi inicialmente calibrado com nujol.

O espectro no IV do polissacarídio A mostrou uma banda larga com intensidade forte na região de 3000 cm^{-1} e em 1050 cm^{-1} , com intensidades médias em 1724 e 1760 cm^{-1} além de múltiplas bandas fracas entre 850 e 810 cm^{-1} . A figura 13 mostra o espectro de IV do polissacarídio A.

O espectro do polissacarídio B mostrou absorções médias em 1724 , 1760 e 980 cm^{-1} e com intensidade forte em 730 cm^{-1} . As bandas em 833 , 875 e 844 cm^{-1} apresentaram intensidade fraca. A figura 14 mostra o espectro do infravermelho do polissacarídio B.

As análises dos espectros do infravermelho nos polissacarídios A e B foram feitas com base em trabalhos de Barker e Stephens(61,62), Orr(63), Cole e Jefferies(64) e Tul'chinski et alii(65).

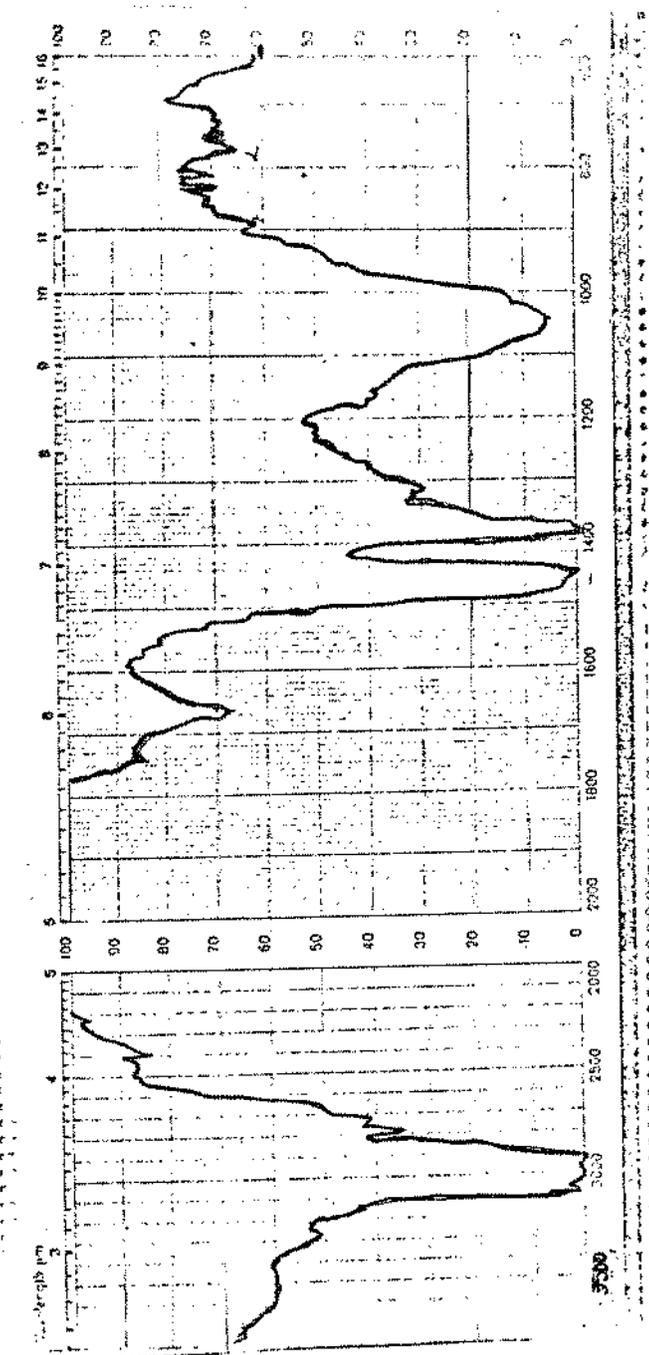


Figura 13 - Espectro na região do IV do polissacarídeo A da A. africana

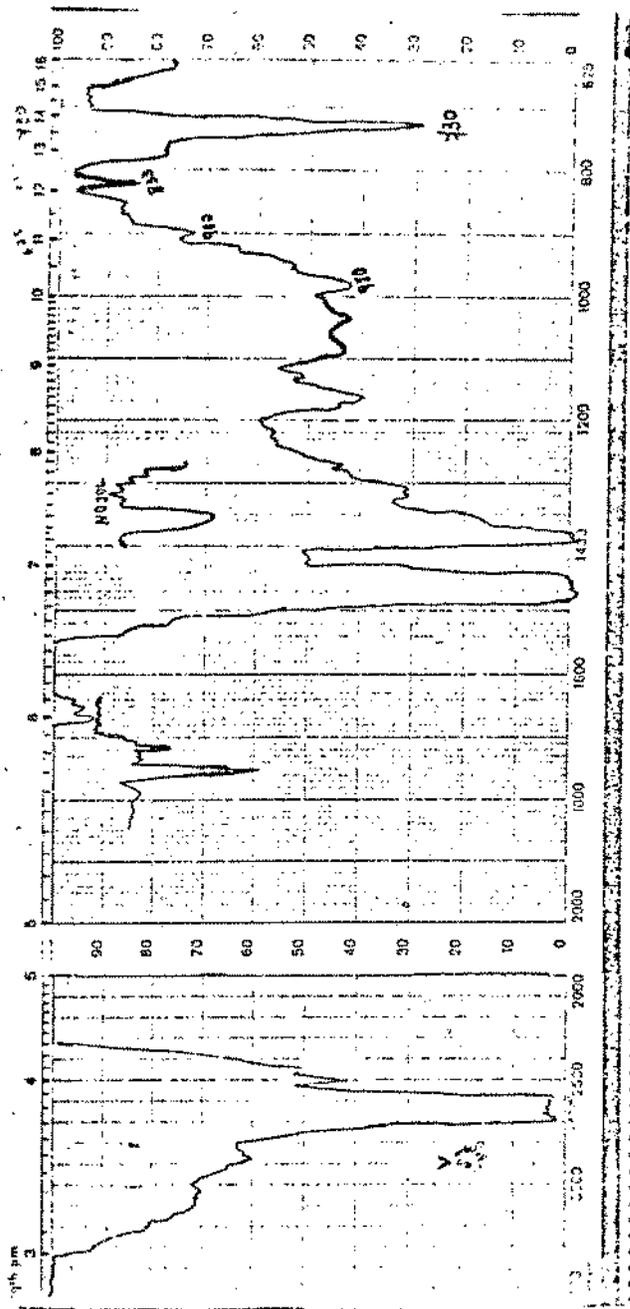


Figura 14 - Espectro na região do IV do polissacarídeo B da A.africana

4.5-10 Espectroscopia da ressonância magnética de carbono¹³

Os espectros de RMC¹³ foram obtidos em 25,2 MHz com trans formada de Fourier em memória de 8 k. Uma amostra com 5 mg do polissacarídeo B foi dissolvida em 850 μ L de D₂O e transferida para microcélula de 12mm. Os espectros foram obtidos a 70°C, os desvios químicos expressos em delta ou ppm e relativos a um padrão externo de TMS.

As condições de análise foram as seguintes: tempo de aquisição 0,4 seg., largura do pulso de 50 μ seg. e o número de transientes de 20 000 a 200 000. A figura 15 mostra o espectro de ressonância magnética de carbono¹³ do polissacarídeo B.

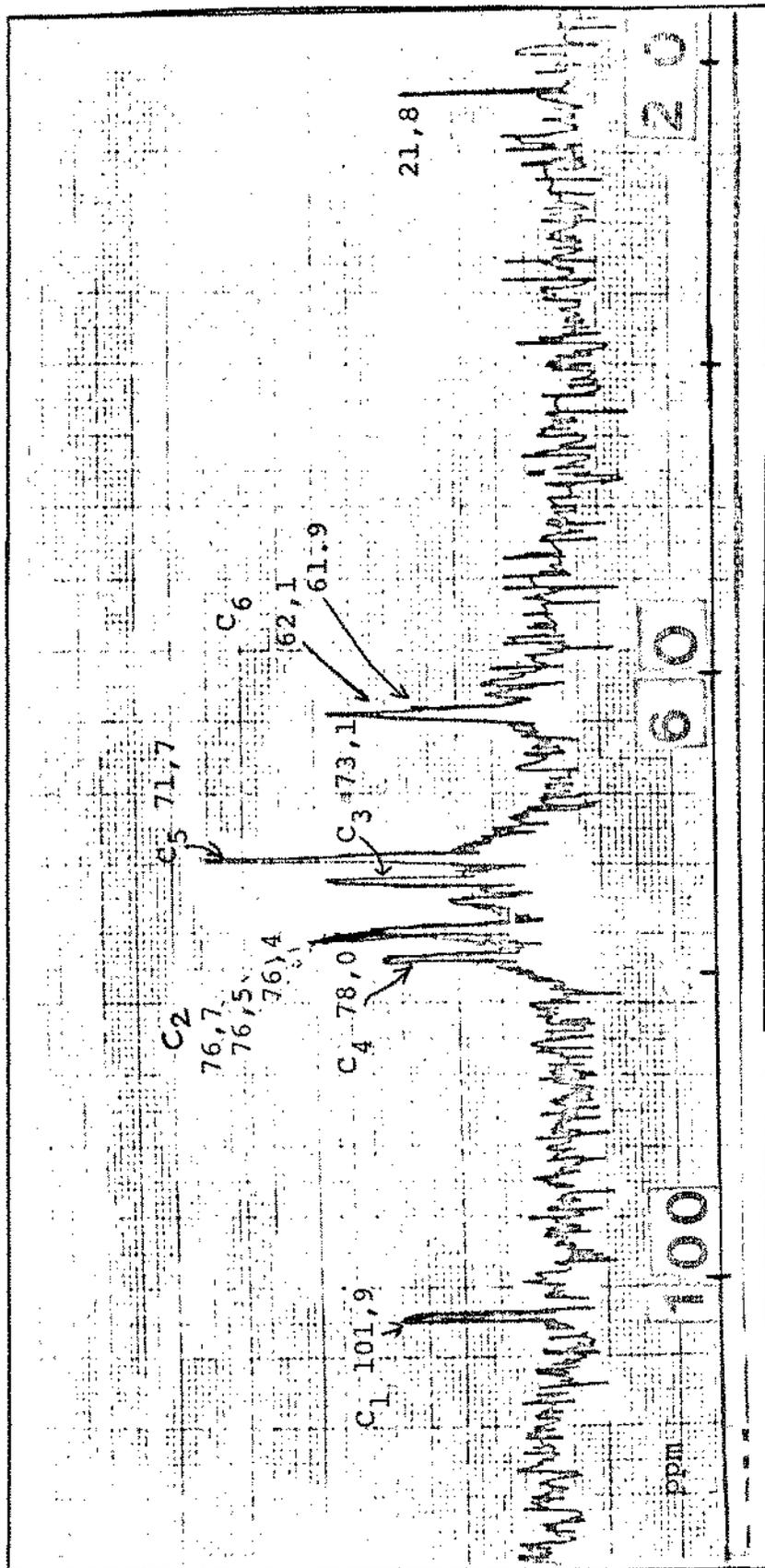


Figura 15 - Espectro de ressonância magnética do carbono¹³ do polissacarídeo B da Aloe africana.

5. DISCUSSÃO

5.1 Métodos

Com base nos métodos usuais descritos na literatura foi otimizado um método de isolamento e purificação dos polissacarídios da Aloe africana. A proteólise do material bruto, isolado numa primeira etapa em rendimentos de 94% em base seca, foi feita com tripsina uma vez que o método de Sevag(53) não apresentou resultados satisfatórios.

As viscosidades da mistura de polissacarídios da Aloe africana foram analisadas em pH. básico, neutro e ácido com base em estudos de viscosidades (66,67,68 69).

As condições de hidrólise foram estabelecidas após experiências prévias nas quais foram empregados ácidos sulfúrico, clorídrico e tri-fluoro-acético. O ácido TFA 3M foi escolhido para as hidrólises totais por ser facilmente eliminado após a reação além de ser um agente hidrolítico forte. Nas hidrólise parciais foi empregado o ácido clorídrico 0,5N uma vez que com o emprego do ácido TFA, mesmo em concentrações mais baixas(1N), a hidrólise é muito rápida não permitindo a observação do desprendimento gradativo dos

resíduos de monossacarídeos.

A espectroscopia na região do infravermelho foi empregada para caracterizar a configuração das ligações glicosídicas através de análises na "região anomérica" (61,62,63,64,65) e definir grupos químicos presentes nos dois polissacarídeos A e B. A ressonância magnética de carbono¹³ foi usada para determinar a regularidade da estrutura primária no polissacarídeo B, como indicar o tipo de anel, configurações e substituições da estrutura (70,71,72,73,74,75,76).

Na identificação e dosagem por CG dos monossacarídeos obtidos na hidrólise total do polissacarídeo B, foram empregados os alditois-O-acetilados que foram separados em coluna com silicone ECNSS-M. Para as análises da metilação-fragmentação, o polímero B foi cromatografado em coluna capilar contendo mistura de silicones OV-17 e OV-225 através, também, de seus derivados alditois-O-acetilados. Foram empregados estes derivados (alditois-O-acetilados) pelo fato de serem facilmente sintetizados além de que cada açúcar mostra uma única banda cromatografica(77). A mistura utilizada na coluna capilar teve estabilidade térmica acima de 250°C e mostrou características química e polaridade semelhantes a ECNSS-M.

Através das análises por CG-EM foram identificados, num sistema sensível, os derivados O-metilados e O-acetilados do polissacarídeo B hidrolisado. Tinha sido já estabelecido por McNeil e Albershein(78) que a intensidade do pico molecular (M^+) pode ser um indicador para definir a hexose em análise. Segundo Mononneu(79), os compostos analisados por CG-EM podem ser detectados em quantidades de até picogramas, mesmo em material biológico bruto.

5.2 Resultados

5.2-1 Mistura dos polissacarídeos da A africana

A eletroforese da mistura de polissacarídeo da Aloe africana mostrou 3 manchas, indicando que a mistura era constituída por 3 polissacarídeos. O fato destas manchas apresentarem mobilidade migratória semelhante levou a conclusão de que os 3 polímeros deveriam ter pesos moleculares com a ordem de grandeza entre 60 000 e 70 000 daltons.

Na hidrólise ácida total da mistura foram identificados 4 açúcares neutros (manose, glucose, galactose e arabinose) além do ácido galacturônico. Foi também verificada que eram de 4% a proporção dos grupos O-acetilicos e os resíduos urônicos constituíam 24% do total da mistura.

No estudo da viscosidade das soluções 0,5% da mistura de polissacarídios, os resultados em 30 e 50 rpm mostraram que esta propriedade aumentava com a diminuição do pH. O maior valor encontrado nesta faixa de velocidade de cisalhamento pertenceu a solução com pH 13; o maior valor foi da solução com pH 4. Estes dados mostraram a importância dos grupos carboxílicos não dissociados na viscosidade dos polissacarídios, em rotações altas.

A diminuição da viscosidade pela adição de NaOH já havia sido observado por outros 2 autores (68,80) porém, em soluções da goma guar (que é uma goma neutra). Em outros estudos foram citadas as influências que a presença de ácidos urônicos (81,82,83) e grupos O-acetílicos (6,84) poderiam exercer no aumento da viscosidade em gomas.

O estudo das viscosidades também mostrou que esta propriedade diminuía com o aumento da velocidade rotacional, caracterizando um comportamento pseudo-plástico. Foi também observado que não havia variação das propriedades espessantes com o tempo.

Um tratamento desta mistura foi feita com cetavlon e a seguir com cloreto de cálcio. O material obtido após purificação com cálcio constituiu 95% da mistura inicial e deu origem a dois polissacarídios. O polissacarídios que preci

pitou como sal de cálcio foi denominado polissacarídeo A. O outro que permaneceu em solução, foi obtido depois de purificado com rendimentos de 82% e recebeu a denominação de polissacarídeo B. Este último biopolímero, por ter sido obtido em muito maior quantidade, teve sua estrutura química estudada mais detalhadamente.

5.2-2 Polissacarídeo A

No tratamento com cetavlon e cloreto de cálcio amoniacal da mistura de polissacarídeos (conforme descrito em 4.4) foi isolado um polissacarídeo ácido (A), com rendimentos brutos de cerca de 10%.

A homogeneidade do polissacarídeo A purificado foi estabelecida por microeletroforese, uma vez que a mobilidade migratória é função do peso molecular e da carga dos polímeros e apenas uma mancha foi revelada nestas análises. A eletroforese tem sido utilizada por outros autores(50,53,69) para verificar a pureza em polissacarídeos.

Na hidrólise total com posterior identificação dos produtos de hidrólise em CP foi identificado o ácido galacturônico como o monossacarídeo presente em maior quantidade. A análise colorimétrica pelo método de Dische(37) confirmou o

ácido galacturônico como o resíduo ácido presente no polisacarídeo A. As análises quantitativas com carbazol indicaram que o biopolímero ácido da A.africana era formado praticamente por resíduos urônicos. Para se estabelecer melhor uma estrutura parcial o polissacarídeo A foi tratado com base, liofilizado e calculado o novo teor de resíduo urônico. Com base nestas análises comparadas (no polissacarídeo A inicial e no polissacarídeo A desesterificado) ficou estabelecida uma proporção de cerca de 1% em esterres.

Foram também identificados e dosados os grupos O-acetílicos. Estas dosagens indicaram que existiam cerca de 16 destes grupos, em média, para 25 resíduos de ácidos galacturônicos. Este resultado mostrou que os monômeros ácidos do polissacarídeo A estavam bastante substituídos por O-acetilas.

O $[\alpha]$ positivo na rotação ótica indicou uma predominância de resíduos com configuração anomérica α . O valor absoluto -125- encontrado estava de acordo com as rotações específicas (85,86,87,88,89,90,91) de outros polissacarídeos contendo na estrutura O-acetilas e resíduos urônicos.

No espectro da região do infravermelho o aparecimento de uma banda em 1050 cm^{-1} indicou a presença de grupos hidro-

xílicos livres. A banda larga na região entre 3000 e 3200 cm^{-1} poderia indicar que estes grupos estavam unidos por ligações de hidrogênio. Foram ainda observadas 2 bandas com intensidades médias em 2 regiões distintas para carbonilas: a 1700 e 1760 cm^{-1} . Absorções entre 845 e 810 cm^{-1} indicaram, segundo Barker e Stephens (61,62) a presença de anéis piranosídicos em ligações glicosídicas α .

Com base nas análises feitas ficou estabelecido que o polissacarídeo A era formado praticamente por unidades de ácidos α -D-galacturônicos acetilados e com baixo teor de esterres. Esta estrutura está de acordo com um ácido pectínico. Uma possível unidade básica para o polissacarídeo A é representada na figura 1 (página xii).

5.2-3 Polissacarídeo B

Os resultados da hidrólise total e determinações quantitativas dos produtos de hidrólise, por CG, indicaram que o polissacarídeo B era formado por 43% de manose, 18% de galactose, 18% de glucose e 5% de arabinose. Pelos resultados das dosagens colorimétricas foram estabelecidas as proporções de 9,4% em ácidos galacturônico além de 6% de grupos acetílicos.

Por meio da hidrólise gradativa com HCl 0,5N foi possível

identificar a liberação gradual dos monossacarídeos. O aparecimento de apenas manose e arabinose após dez minutos de reação indicou que estes dois açúcares faziam parte das terminações não redutoras do polissacarídeo. O fato do ácido galacturônico ter sido identificado com 20 minutos de hidrólise, antes do aparecimento da glucose e da galactose e o fato de que hidrólise ácida de resíduos urônicos sempre é mais difícil do que a hidrólise de unidades neutras, levou à conclusão de que os ácidos galacturônicos também faziam parte dos resíduos terminais não redutores do polissacarídeo B.

O espectro infravermelho mostrou duas bandas em 1724 e 1760 cm^{-1} na região referente à carbonilas. A presença de pico com intensidade forte em 730cm^{-1} foi atribuído, com base em trabalho de Cole e Jefferies(64), a vibração anomérica de uma β -D-galactose acetilada. As bandas mais fracas que apareceram em 833, 875 e 844cm^{-1} foram atribuídas às estruturas piranosídicas de β -D-manose e β -D-glucoses, segundo Barker e Stephens(61,62). Uma absorção com intensidade média em 980cm^{-1} pode indicar, segundo Tul'chinski et alii(65), a presença de uma β -D-manose acetilada.

O valor negativo encontrado na rotação ótica indicou a predominância de ligações glicosídicas com a configuração β

entre os açúcares constituintes do polissacarídeo em estudo.

Na oxidação com periodato foram obtidos eritritol, gliceraldeído, glicerol e gliceraldeído além de galactose e manose. A recuperação destes monossacarídeos, após degradação com o oxidante, indicou que alguns resíduos de manose e galactose não possuíam grupos hidroxílicos vicinais livres.

Os produtos isolados em maior quantidade - eritritol e gliceraldeído - devem ser provenientes de manopiranoses e glucopiranoses em ligações glicosídicas 1 → 4 com as hidroxilas em C₂ e C₃ livres, uma vez que resíduos de galactopiranoses 1 → 4 dariam origem ao treitol.

Entre os produtos da oxidação do polissacarídeo B, não foi encontrado o formaldeído o que indicou a ausência de hexoses na forma furanosídica e com as hidroxilas das posições seis e cinco livres.

A presença do glicerol indicou que algumas unidades na estrutura do polissacarídeo B estavam com as hidroxilas nas posições três e quatro livres, como por exemplo em ligações glicosídicas 1 → 2 e 1 → 6. Outras possibilidades para explicar o aparecimento do glicerol, seriam os resíduos de

hexose piranosídicas terminais ou pentoses furanosídicas com as hidroxilas nas posições dois e três livres, nas extremidades não redutoras das cadeias.

A formação do gliceraldeído, em proporção menor do que a encontrada para o glicerol, indicou que alguns resíduos ligados em 1 → 6 teriam substituintes nas posições dois.

Os seis sinais representativos do espectro de ressonância magnética do carbono¹³ (figura 15) foram todos atribuídos às unidades de manose, que constituíam cerca de 43% da estrutura do polissacarídeo B. Os outros resíduos de monossacarídeos foram encontrados em proporções menores com relação a manose o que poderia explicar o fato de não aparecerem, com intensidade fortes, sinais no espectro relativos a estes açúcares.

Foi verificada a ausência de sinais no intervalo de 79 a 85 ppm; esta região, segundo Perlin et alii (76) estaria relacionada com anéis furanosídicos. De fato, na análise de metilação, o único açúcar encontrado na forma furanosídica foi a arabinose. As análises no infravermelho haviam também indicado que a maioria dos açúcares estava na forma piranosídica.

O espectro da R M C¹³ mostrou dois picos - a 61,9 e 62,1 ppm - que foram atribuídos aos carbonos de grupos hidroxílicos primários não substituídos. O aparecimento de dois sinais indicou que as manoses teriam os carbonos seis em ambientes diferentes, o que foi confirmado após análises por CG-EM da metilação - fragmentação.

Não apareceram sinais na região correspondente a hidroxilas substituídas em C₆ de manoses. Estes sinais apareceriam em campo de energia mais baixa ao redor de 73 ppm (24, 27,94) ou em 69,6 ppm (92). Barreto-Bergter (92) descreveu os valores para carbono seis em outras açúcares (também encontradas no polissacarídeo B) que eram: β -D-glucopiranosose 1 \rightarrow 4 em 61,5 ppm, β -D-glucopiranosose 1 \rightarrow 3 em 61,4 ppm, β -D-glucopiranosose 1 \rightarrow 2 em 61,4 ppm, β -D-glucopiranosose 1 \rightarrow 6 em 70,7 ppm e β -D-galactofuranose 1 \rightarrow 6 em 76 ppm. Estes dados confirmaram o fato de que os picos encontrados no espectro de RMC¹³ do polissacarídeo B eram referentes a manoses.

O sinal único - pico em 78 ppm - que foi assinalado para C₄ substituído está de acordo com os deslocamentos químicos de resíduos piranosídicos de manoses β -1 \rightarrow 4. A configuração beta para a maioria dos açúcares no polissacarídeo B já havia sido indicada pelas absorções no IV e pelo valor negativo da rotação ótica. Uma maioria de ligações

entre manoses 1 + 4 ficara indicada nos resultados da oxidação com periodato.

Foi observado um único pico na região característica de carbono anomérico (71,72,73,74,75,92). Este sinal, em 101,9 ppm, foi atribuído a resíduos de β -D-manopiranoses. Para outros polissacarídios descritos na literatura, e formados também por unidades de β -D-manopiranoses, foram estabelecidos para o carbono um os deltas 102(74) e 101,7(93).

Em polissacarídios constituídos por α -D-manopiranoses o C_1 aparecia na região compreendida entre 102,5 e 103,7 ppm (21,27,72,75). Os sinais relativos ao carbono anomérico de α e β -D-manofuranoses(94) apareceriam, respectivamente, em 102,4 e 96,9 ppm. Em trabalhos de Previato(35), Gorin et alii(27,72,74) e Barreto-Bergter(92) foram descritos os deslocamentos químicos referentes ao carbono anomérico de polissacarídios contendo galactose, glucose e arabinose (que são os outros resíduos do polissacarídio B). Foram descritos os valores: em 104,8 ppm para β -D-glucopiranoose, em 102,3 ppm para α -D-glucopiranoose, em 101 ppm para amilose e 102,7 ppm para amilose cíclica, em 105 ppm para β -D-galactopiranoose, entre 107 e 109 ppm para β -D-galactofuranose e 110 ppm para L-arabinofuranose. Não foram observados no espectro de RMC¹³ do polissacarídio B os

deslocamentos químicos estabelecidos por estes autores, pelo menos com intensidade tal que permitissem uma identificação melhor das configurações anoméricas.

Foi assinalado por Gorin et alii (17,21,74) que sinais para o C_1 de β -D-manopiranoses com ligações alternadas 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4 apareciam em 77,9 e 98,1 ppm, portanto em região diferente da observada para o carbono um do polissacarídeo em estudo. Assim, foi eliminado este padrão de estrutura para o polissacarídeo B. Por outro lado, Sayed et alii (95) estabeleceram para o carbono anomérico em polímeros contendo manoses 1 \rightarrow 6, um valor bastante próximo ao delta observado no espectro em estudo. Entretanto, as ligações glicosídicas 1 \rightarrow 6 foram eliminadas uma vez que no espectro de RMC¹³ foram encontradas absorções de carbono seis somente com hidroxilas não substituídas. Além disto, para um polímero contendo maioria de ligações 1 \rightarrow 6 haveria, após oxidação com periodato, um predomínio marcante do glicerol sobre os outros produtos de degradação e considerável variação do teor de ácido fórmico liberado.

Uma vez que havia sido encontrado o glicerol (4%) entre os produtos da reação com o oxidante ficou indicado que alguns resíduos deveriam estar ligados em 1 \rightarrow 6, o que efetivamente foi observado nos produtos de metilação e fragmentação.

tação.

Ainda, nas análises por RMC¹³ apareceu um sinal em 21,8 ppm que foi atribuído ao CH₃ do grupo O-acetílico. Com base em estudos de ressonância do carbono¹³ no manitol di e tri-O-acetilado, feitos por Matsuhira e Baker (96), as acetilas nas manoses devem estar ligadas nas posições dois. Os sinais em 76,7 - 76,5 - 76,4 ppm do espectro de RMC¹³ do polissacarídeo B foram atribuídos, respectivamente, ao C₂ substituído por grupo O-acetila e a duas hidroxilas livres no carbono dois em ambientes diferentes.

Outros 2 sinais observados no espectro de RMC¹³ foram atribuídos, de acordo com os deslocamentos químicos descritos na literatura à metil-β-D-manopiranoses (73) e uma β-D-manana (95): Os valores em 73,1 e 71,7 ppm correspondem, respectivamente, aos deslocamentos químicos dos carbonos três e cinco em unidades de manoses β-1 → 4. Os resultados do espectro de RMC¹³ indicaram que a maior parte da estrutura do polissacarídeo B era constituída por β-D-manopiranoses, em ligações glicosídicas 1 → 4, parcialmente acetiladas na posição dois.

Os resultados das análises por CG-EM mostraram um pico inicial (pico 1) que foi identificado por seu tempo de reten-

ção e padrões de fragmentação no espectro de massa (58) como sendo, arabinofuranose tri-O-metilada em 2,3,5. A existência de arabinofuranose já havia sido indicado na hidrólise parcial com HCL 0,5N uma vez que esta pentose foi identificada em cromatografia em papel, com apenas 10 minutos de reação.

Foram identificados por co-injeção os seguintes compostos: 2,3,4,6-tetra-O-metil-1,5-di-O-acetil-manitol (pico 2), 2,3,6-tri-O-metil-1,4,5-tri-O-acetil-manitol (pico 4), 2,3,6-tri-O-metil-1,4,5-tri-O-acetil-glucitol (pico 5), 2,3,4-tri-O-metil-1,5,6-tri-O-acetil-galactitol (pico 6) e 2,4-di-O-metil-1,3,5,6-galactitol (pico 7). As fragmentações observadas no espectro de massa destes compostos estavam de acordo com aquelas observadas por Jansson et alii (58).

O pico correspondente ao ácido galacturônico (pico 3), foi tentativamente identificado pelas fragmentações e pico molecular observados no espectro de massa e correlacionados com outros trabalhos em CG-EM de resíduos urônicos descritos na literatura (88,89,90,97,98,99). Estes monossacarídeos devem estar situados nas extremidades não redutoras do polissacarídeo B.

Por comparação dos tempos de retenção em alditois metil-O-

-acetilados, analisados em coluna capilar contendo mistura de OV-17 e OV-225(59) ou coluna capilar com apenas OV-225 (58,60,99), o pico 8 foi atribuído ao 3,4-di-O-metil-tetra-O-acetil galactitol. Nestes 4 trabalhos (58,59,60,99) foi estabelecido que galactoses piranosídicas 1 → 6 ramificadas nas posições dois eluíam posteriormente a resíduos quando eram ramificados nas posições três. Ficou estabelecido assim, que os picos 7 e 8 correspondiam, respectivamente, as unidades de galactose 1 → 6 com substituintes nas posições três e dois. Estes resultados mostraram que nesta eram feitas as ramificações do polissacarídeo B uma vez que somente foi encontrado a galactose di-metilada. As unidades de arabinofuranoses e ácido galacturônico foram encontradas exclusivamente como resíduos terminais não redutores.

Os valores computados nos espectros de CG-EM indicaram que a relação dos resíduos terminais do polissacarídeo B era 2:1:3, respectivamente para arabinose, manose e ácido galacturônico e, em quantidades correspondente a 17,4% dos valores totais. Foi também estabelecido, nas análises de CG-EM, que as cadeias principal e laterais estavam formadas por resíduos de manopiranoses ligadas nas posições um e quatro, galactopiranoses ligadas em um e seis, galactopiranoses 1 → 6 ramificadas nas posições três e galactopiranoses 1 → 6

ramificadas nas posições dois, com as proporções 12:6:1:3:2, respectivamente.

As localizações dos grupos O-acetílicos foram tentativamente indicadas com base nos resultados da ressonância magnética do carbono¹³ e pelos resultados da oxidação com periodato que estabeleceram a redução de 0,63 moles de oxidante com formação de 0,09 moles de ácido fórmico, por mol de anidrohexose.

A figura 1 (página xii) mostra uma possível estrutura do polissacarídeo B isolado da Aloe africana.

6. CONCLUSÕES

Em face dos resultados experimentais deste trabalho ficou estabelecido que:

- . A goma da Aloe africana é constituída por 3 polissacarídeos.
- . As soluções diluídas da mistura de polissacarídeos tem comportamento pseudo-plástico.
- . A capacidade espessante dos biopolímeros da A.africana é dependente do pH de suas soluções e não depende do tempo.
- . O polissacarídeo A tem a estrutura de um ácido pectínico.
- . O polissacarídeo B é formado por unidades de D-manose , D-glucose, D-galactose, ácido D-galacturônico e arabinose, nas proporções 13:6:6:3:2, respectivamente.
- . As ramificações da cadeia principal estão ligadas às galactoses, nas posições dois e três, no polissacarídeo B.
- . As unidades terminais não redutoras do polissacarídeo B são unidades de ácidos galacturônico, manoses e arabinoses nas proporções 3:1:2, respectivamente.
- . Existe uma predominância de ligações glicosídicas β no polissacarídeo B.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roboz, E & Haagen-Smith, M. - 1948 - "A mucilage from Aloe vera", J. Amer. Chem. Soc. 70:3248.
2. Kubal, J.V. & Gralen, N. - 1948 - "Properties of locust bean mucilage", J. Colloid. Sci. 3:457.
3. Palmer, K.L & Ballantyne, M. - 1950 - "The structure of some pectins and guar galactomannans", J. Amer. Chem. Soc. 72 :736.
4. Wistler, R.L. & Durso, D.F. - 1952 - "A new crystalline trisaccharide from partial acid hydrolysis of guaran", J. Amer. Chem. Soc. 74:5140.
5. Kapoor, V.P. - 1972 - "A galactomannan from the seeds of Delonix regia", Phytochem. 11:1129.
6. Misaki, A. ; Ito, T. ; Harada, T. - 1972 - "Polysaccharide from the Dioscorea batatas Decne, forma Tsukune" , Agr. Biol. Chem. 36:761.
7. Tomoda, M. ; Nakatsuka, S. ; Sato, N. - 1974 - "Plant mucic-

lage IX - Polysaccharide Bletilla-glucomannan from Bletilla striata", Chem. Pharm. Bull. 22:2710.

8. Orodova, R.G.; Rapchih, V.F.; Orodov, Y.S. - 1975 - "Polysaccharide from Aloe arborescens", Khim. Prir. Soedin 11:3 (cf Chemical Abstracts 83:93833)
9. Tomoda, M.; Kaneko, S.; Nakatsuka, S. - 1975 - "Plant mucilage X - Isolation and characterization of polysaccharide Lilium-A-glucomannan", Chem. Pharm. Bull. 23:430.
10. Seymour, F.; Slodki, M.E.; Plattner, R.D.; Stodola, R.M. - 1976 - "Methylation and acetolysis of extracellular D-mannans from yeast", Carb. Res. 48:225.
11. Harris, L.S. & Gray, G.R. - 1977 - "Acetylated methylmannose polysaccharide of Streptomyces griseus", J. Biol. Chem. 252:2470.
12. Maitra, S.K. & Ballou, C.E. - 1977 - "Heterogeneity and refined structures of 3-O-methyl-D-mannose polysaccharides from Mycobacterium smegmatis", J. Biol. Chem. 252:2459.
13. Bardalaye, P.C. & Nordin, J.H. - 1977 - "Chemical structure

- re of the galactomannan from the cel wall of Aspergillus niger", J.Biol. Chem. 252:2584.
14. Paulsen, B.S.; Fagerhein, E.; Overbye, E. - 1978 - "Structural studies of the polysaccharide from Aloe plicatilis Miller", Carb. Res. 60:345.
15. Walter, G.R.; Mangiafico, S.; Ritchey, C.R. - 1978 - "A chemical investigation of Aloe barbadensis Mill, polysaccharide", Proc. Okla. Acad. Sci. 58:69 (cf Chem. Abs, 90:3177).
16. Gowda, D.C.; Neelisiddaiah, B.; Anjaneyale, Y.V. - 1979 - "Structural studies of polysaccharide from Aloe vera", Carb. Res. 72:201.
17. Alviano, C.S.; Gorin, P.A.J.; Travassos, L.R. - 1979 - "Polysaccharides of Ceratocystis paradoxa e fimbriata", Exp. Mycol. 3:174.
18. Gowda, D.C. - 1980 - "Structural studies from Aloe saponaria e Aloe vanbalenii polysaccharides", Carb. Res. 83:402.
19. Gaurhari, M. & Das, A. - 1980 - "Structure of the D-galactan isolated from Aloe barbadensis Miller", Carb.

Res. 86:247.

20. Gaurhari, M. & Das, A. - 1980 - "Structure of the glucomannan isolated from the leaves of Aloe barbadensis Miller", Carb.Res. 87:249
21. Barreto-Bergter, E.M.; Travassos, L.R.; Gorin, P.A.J. -
- 1980 - "Chemical structure of the D-galacto-D-mannan component from Aspergillus spp", Carb.Res. 86:273.
22. Hranisavljevic-Iakovljevic, M. - 1981 - "Structural studies of an acidic polysaccharide from Aloe arborescens Mill., Glass.Hem.Drus.Beograd. 46:269 (cf Chem. Abs. 94:31629)
23. Wilkinson, S.G. - 1981 - "Structural studies of an acetylated mannan from Pseudomonas diminuta N.C.T.C. ", 8545" , Carb.Res. 93:269.
24. Bociek, S.M. ; Izzard, M.J.; Morrison, A.; Welte, D. - 1981 - ¹³C - n.m.r. spectra of (1 → 6)- α -D-galactosyl - (1 → 4)-D-mannans", Carb.Res. 93:279.
25. Cherniak, R.; Reis, E.; Turner, S. - 1982 - "A galactoxylo-mannan antigen of Cryptococcus neoformans serotype A", Carb.Res. 103:239.

26. Yamada, H.; Oshima, Y.; Miyazaki, T. - 1982 - "Characterization of fucomannopeptide and mannoprotein from Absidia cylindrospora", Carb. Res. 110:113.
27. Gorin, P.A.J. & Mazurek, M. - 1982 - "Assignment of carbon-13 signals in nuclear magnetic resonance of D-galactopyrano- β -D-manopyrannans from yeasts", Carb. Res. 105:283.
28. Figueiredo, A.A. - 1983 - "Extração e identificação do polissacarídeo da algarobeira: Prosopis juliflora, D.C.", Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment. 3:82.
29. Radjabi, F.; Amar, C.; Vilkas, E. - 1983 - "Structural studies of the glucomannan from Aloe vahombe", Carb. Res. 116:166.
30. A.O.A.C. - 1980 - Official Methods of Analysis of the Assn. of Official Chemists, Editor Horwitz, Washington.
31. Litwach, G. - 1967 - Experimental Biochemistry, Ed. John W. Sons, Tradução espanhola da Ed. Omega S.A., Espanha, página 29.
32. McCready, R.M. & Hassid, W.Z. - 1943 - "The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in

in potato starch", J.Amer. Chem. Soc. 65:1154.

33. McComb, E.A. & McCready, R.M. - 1957 - "Determination of acetyl in pectin in acetylated carbohydrate polymers", Anal. Chem. 29:819.
34. Somogyi, M. - 1945 - "A new reagent for the determination of sugars", J. Biol. Chem. 160:61.
35. Previato, J.O. - 1982 - "Estudo da parede celular de Sporothrix schenckii", Tese de doutoramento apresentada ao Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 113 páginas.
36. Galambos, J.T. - 1967 - "The reaction of carbazole with carbohydrates I-Effect of borate and sulfamate on the carbazole colors of sugars", Anal. Biochem. 19:119.
37. Dische, Z. - 1948 - "A new specific color reaction of galacturonic acid", Arch. Biochem. 16:409.
38. Legget, J.B. - 1967 - Techniques in Protein Chemistry, Els. Publishing Company, N.Y., pg 346.
39. Bradford, M.M. - 1976 - "A rapid and sensitive method

for the quantitation of microgram quantities of pro
teins utilizing protein-dye binding", Anal. Biochem.
72:248.

40. Lato, M.; Brunelli, B.; Ciuffini, G.; Mezzeti, T. - 1968 -
"Bidimensional thin-layer chromatography of carbo-
hydrates", J.Chrom. 34:26.
41. Krebs, K.G.; Heusser, D.; Winner, H. - 1969 - Thin-Layer
Chromatography, Ed. Stahl, N.Y., Springer, Verlag,
pg. 854
42. Mourão, P.A.S & Dietrich, C.P. - 1976 - "Simple micro -
method for identification of heparin and other aci-
dic mucopolysaccharides", Anal. Biochem. 46:209
43. Meer, G.; Meer, W.A.; Tinker, J. - 1975 - "Water-soluble
gums: Their past, present and future", Food Technol.
29:22.
44. Horowitz, R. - 1956 - "Flavonoids of citrus I - Isola -
tion of diosmin from lemons", J.Org.Chem. 21:1184.
45. Suzuki, S. & Stominger, J.L. - 1960 - "Relations between
the structure of the simple sugar and their behavi-
our on the paper chromatogram", J.Biol.Chem. 235:257.

46. Loyd, K.O. - 1970 - "Isolation, characterization and partial structure of peptido-galactomannan from the yeast form of C.werneckii", Biochemistry 9:3446.
47. Previato, J.O. & Mendonça-Previato, L - Comunicação pessoal.
48. Sawardeker, J.S.; Sloneker, J.H.; Jeanes, A. - 1965 - "Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography", Anal. Chem. 37:1602.
49. Hamilton, J.K. & Smith, F. - 1956 - "Reduction of the products of periodate oxidation of carbohydrates II-A new method for the end-group", J. Amer. Chem. Soc. 78:5907.
50. Mourão, P.A.S - 1978 - "Mucopolissacarídeos sulfatados" - Tese de doutoramento apresentada a Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 125 páginas.
51. Kremer, B. - 1978 - "Improved method for TLC identification of alditols", J.Chrom. 166:335.
52. Hay, G.W.; Lewis, B.A.; Smith, F. - 1963 - "Thin-film chromatography in the study of carbohydrates", J.Chrom.

11:479.

53. Hay, G.W.; Lewis, B.A.; Smith, F - 1965 - Methods in Carb. Chem., Volume V, Ed. Whistler, R.L., Academic Press, N.Y., pg. 357 (oxidação)
54. Anderson, D.M.; Greenwood, C.T.; Hirst, E.L. - 1955 - "Physicochemical studies on starches II-The oxidation of starches by potassium periodate", J.Chem. Soc. 5:225.
55. Rankin, J.C. & Jeanes, A. - 1950 : "Evaluation of the periodate oxidation for structural analysis of dextrans", J.Amer. Chem.Soc. 72:2655.
56. Hirst, E.C. & Percival, E. - 1965 - Methods in Carb. Chem. Volume V, Ed. Whistler, R.L., Academic Press, N.Y., página 287.
57. Gorin, P.A.J. - Comunicação pessoal.
58. Jansson, P.E.; Kenne, L; Liedgren, H.; Lindberg, B.; Lonngren, J. - 1976 - "A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates", Chem. comun. Univ. Stockholm, 8.

59. Gorin, P.A.J.; Giblin, E.M.; Slater, G.P.; Hogge, L. -
1982 - "Improved resolution of 3-methylalditol acetates by gas-liquid chromatograph on capillary columns with blended coatings of OV-17 and OV-225", Carb.Res. 106:235.
60. Barreto-Bergter, E.; Hogge, L.; Gorin, P.A.J. - 1981 -
"Gas-liquid chromatograph of partially methylated alditol acetates on capillary columns of OV-17 and OV-225", Carb.Res. 97:147.
61. Barker, S.A. & Stephens, R. - 1954 - "Infra-red of carbohydrates II - Anomeric configuration of some hexo and pento-pyranoses", J.Chem.Soc. 4:3468.
62. Barker, S.A. & Stephens, R. - 1954 - "Infra-red of carbohydrates IV-Characterization of furanose derivative", J.Chem.Soc. 4:4550.
63. Orr, S.F.D. - 1954 - "Infra-red of oligosaccharides", Biochem. Biophys, Acta 14:171.
64. Cole, A.R.H. & Jefferies, P.R. - 1956 - "Stereochemistry of cyclohexane derivatives V-Infra-red spectra and conformations of 1-2 diol", J.Chem.Soc. 43:4391.

65. Tul'chinsky, W.M. & Zurabyan, S.E. - 1976 - "Study of infra-red spectra oligosaccharide in the region 1000 - 40cm⁻¹", Carb.Res. 51:1.
66. Thomas, A.W. & Murray, H.A. - 1928 - "A physico-chemical study of gum arabic", J.Phys.Chem. 32:676.
67. Owns, H.S.; Lotzhar, H.; Merril, R.C. - 1944 - "Viscosities of pectin solutions", J.Amer.Chem.Soc. 66:1178.
68. Barry, J.A. & Halsey Jr., G.D. - 1963 - "Dilute solutions properties of a neutral polysaccharide", J.Phys.Chem. 67:2821.
69. Reyes, F.G.R., - 1978 - "Polissacarídeo da palma gigante (Opuntia ficus indica Mill.): Propriedades e estrutura" - Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP, SP, 87 páginas.
70. Spencer, J.T. & Gorin, P.A.J. - 1973 - "Biotechnology review - Mannose containing polysaccharide of yeast", J.Biotechnol. Bioeng. 15:1
71. Gorin, P.A.J. - 1975 - "Assignment of signals of the

carbon - 13 magnetic resonance spectrum of a selected polysaccharide:Comments on methodology", Carb. Res. 39:3.

72. Gorin, P.A.J.; Haskins, R.H.; Travassos, L.R.; Mendonça-Previato, L. - 1977 - "Further studies on the Sporothrix schemckii and Ceratocystis stenoceras polysaccharide", Carb. Res. 55:21.
73. Gorin, P.A.J. & Mazurek, M. - 1977 - "Studies on the assignment of signals in C^{13} magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides", Can. J. Chem. 53:1212.
74. Gorin, P.A.J. - 1980 - "Structural studies on fungal polysaccharides using Carbon-13 and proton NMR spectroscopy", ACS Sym., Ser. 126, Ed. Sandford and Matsuda, N.Y. página 159.
75. Perlin, A.S.; Casu, B.; Koch, H.J. - 1970 - "Configurational and conformational influence on the carbon-13 chemical shifts of some carbohydrates", Can. J. Chem. 48:2596.
76. Perlin, A.S.; Ritchie, R.G.S.; Cyr, N.; Koch, H.J. - 1975 - "Carbon-13 chemical shifts of furanosides and cy -

clopentanols", Can.J.Chem. 53:1424.

77. Sweet,P.D.; Shapiro.R.H.; Albershein,P. - 1975 - "Quantitative analyse by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates", Carb.Res. 40:217.
78. McNeil,M & Albershein,P - 1977 - "Chemical-ionization mass spectrometry methylated hexitol acetates" , Carb.Res. 56:239.
79. Mononneu,I. - 1981 - "Quantitative analysis by gas-liquid chromatography and mass fragmentography of monosaccharide after metanolysis", Carb.Res. 88:39.
80. Sackman,L.A.; Scrivener,O.; Drykoninger,J. -1971-Écoulement de fluides non newtoniens dans le conduites . Evolution des parametres rheologiques de solutions de gome de guar", C.R.Acad.Sc., Ser.A 272:544.
81. Kortschak,H.D. - 1939 - "Eletrolytes and the viscosity of pectin solutions", J.Amer.Chem.Soc. 61:2313.
82. Hodsworth,S.D. - 1971 - "Aplicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products", J.Texture Stud.

83. Sharma, S.C. - 1981 - "Gums hydrocolloids in oil-water emulsions" *Food Technol.* 35:59.
84. Delben, F.; Cesaro, A; Paoletti, S. - 1982 - "Monomer composition and acetyl content as main determinants of the behavior on alginates", *Carb.Res.* 100: C₁.
85. McEwant, G.A. & McInnes, D.S. - 1982 - "¹H and ¹³C-n.m.r. spectra of the methyl mono - and di - and tri-O - acetyl- and β-D-xilopyranosides", *Carb.Res.* 104:161.
86. Bolton, C.B. & Siehr, D.J. - 1979 - "Structure of alkali-soluble polysaccharide from the hyphal wall of Coprinus macrorhizus", *Carb.Res.* 77:169.
87. Basak, R & Mandal, P - 1982 - "Investigation on the structure of a hemicellulose fraction isolated from trunk of Aegle marmelos tree", *Carb.Res.* 104:309.
88. Basak, R. & Mandal, P - 1982 - "Structural studies on a polysaccharide obtained from the cambium layer of a young bael tree", *Carb.Res.* 110:155.

89. Kamerling, J.P.; Lindberg, B.; Lonngren, J.; Nimmich, W.
- 1975 - "Structural studies of the Klebsiella type 57 capsular polysaccharide", Acta Chem. Scand. - Ser. B 29:593.
90. Joseleau, Jean-Paul & France-Marais, M. - 1979 - "Structure of the capsular polysaccharide of Klebsiella type 63", Carb. Res. 77:183.
91. Tomoda, M. & Tanaka, M. - 1973 - "Isolation of 3 disaccharides from the Plantago major", Chem. Pharm. Bull. 21:989.
92. Barreto-Bergter, E. & Gorin, P.A.J. - 1983 - "Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens", Adv. Carb. Chem. Biochem. 41:67.
93. Grasdalen, H. & Painter, T. - 1980 - "NMR studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans", Carb. Res. 81:59.
94. Wilbur, J.D.; William, C.; Allerhand, C - 1977 - "Detection of the furanose anomers of D-mannose in solution. Application of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance", J. Amer. Chem. Soc. 99:5450.

95. El Sayed, H.E. & Schuerck, C - 1982 - "Stereoselective synthesis of 1,2-cis and 1,2-trans-D-mannopyranosides", Carb.Res. 105:33.
96. Matsuhiro, B. & Baker, P.M. - 1981 - "Anomalous α -effects due to esterification in ^{13}C -n.m.r. spectra of derivatives of D-mannitol", Carb.Res. 89:326.
97. Das, A.; Heidelberger, M.; Brown, R. - 1976 - "Identification of D-galacturonic acid in the specific capsular polysaccharide of pneumococcal XXV", Carb. Res. 48:304.
98. Kovacik, V.; Mikalov, V.; Kovac, P - 1977 - "Identification of methyl (methyl-O-acetyl-O-methylexopyranosid) uronates by mass spectrometry", Carb.Res. 54:23.
99. Lindberg, B. ; Lonngren, J.; Thompson, J.L.; Nimmich, W. -
- 1972 - "Structural studies of the Klebsiella
9 capsular polysaccharide", Carb.Res. 25:49.