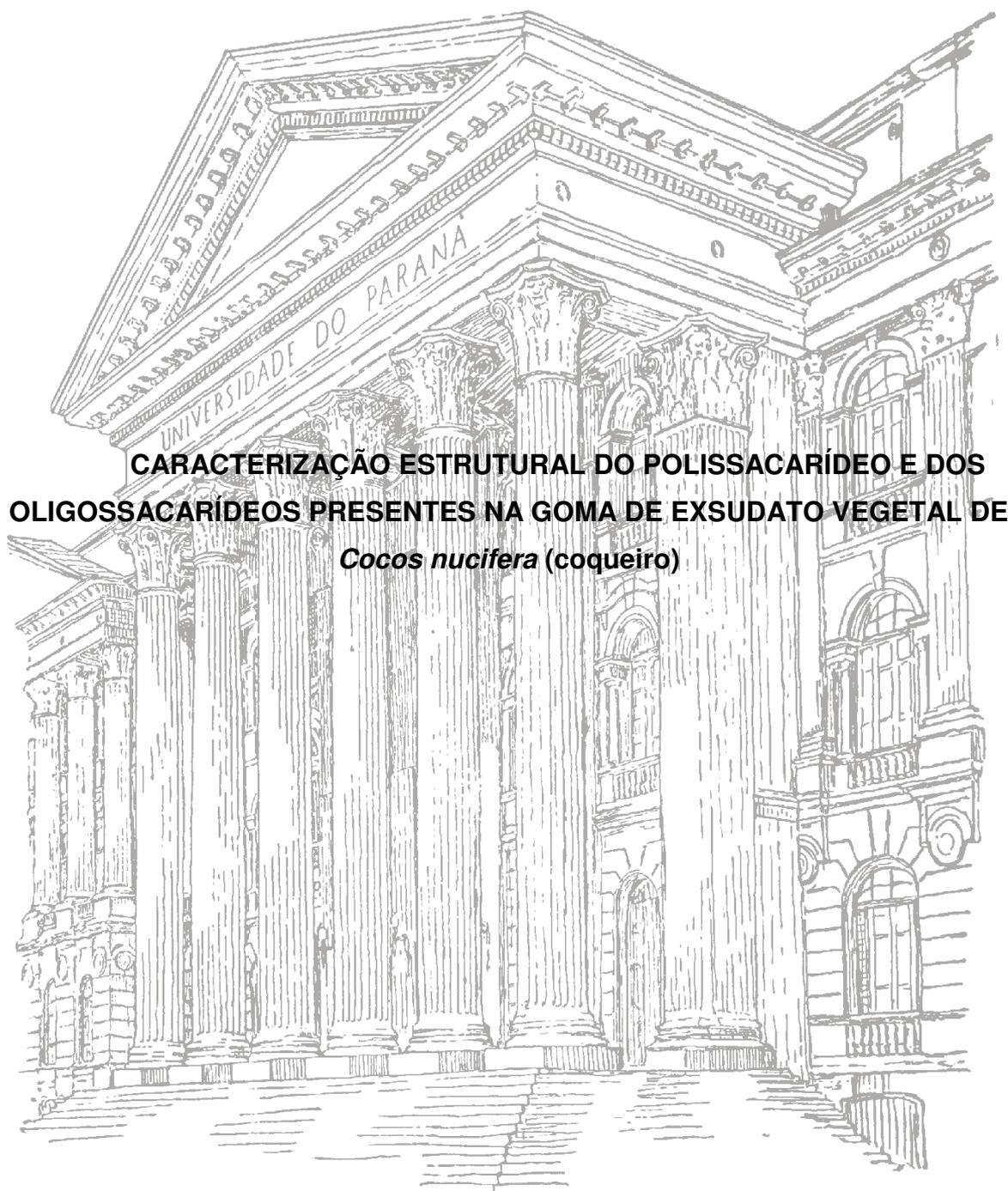


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**RUTH ROCIO BARRAZA**



**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO E DOS  
OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NA GOMA DE EXSUDATO VEGETAL DE  
*Cocos nucifera* (coqueiro)**

**CURITIBA**

**2008**

**RUTH ROCIO BARRAZA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO E DOS  
OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NA GOMA DE EXSUDATO VEGETAL DE  
*Cocos nucifera* (coqueiro)**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Bioquímica como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki  
Co-Orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

**CURITIBA**

**2008**

Com todo o carinho e amor:  
Aos meus pais Rolando e Adelaide, e  
aos meus irmãos Rolando e Ronaldo.  
Pelo apoio, carinho e compreensão e  
principalmente por estarem sempre  
presentes na minha vida, como uma  
família da qual eu me orgulho muito.

Amo muito vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Guilherme Sasaki, meu orientador, por ter me aceitado neste processo. Obrigada pelo apoio!

Ao Prof. Philip A. J. Gorin, meu orientador durante todo o período de iniciação científica. Obrigada pela oportunidade, orientação, ensinamentos e pelo exemplo de uma vida dedicada à ciência.

À Fernanda Simas, que foi quem primeiramente me recebeu no departamento de bioquímica de carboidratos. Muito obrigada! Por ter acreditado em mim, pela sua dedicação, disponibilidade, pelo incentivo, pelos inúmeros ensinamentos, apoio e pela paciência. Obrigada por tudo!

Ao Ricardo Wagner, que também me ensinou e incentivou nas pesquisas com as gomas de exsudatos! Também, muito obrigada!

Ao professor Macello Iacomini, pelo exemplo de uma vida dedicada à pesquisa.

Aos meus pais Rolando e Adelaide! Obrigada por me proporcionarem as oportunidades de dedicar-me aos estudos, pelo apoio de sempre, independente do que for. Obrigada pelo carinho, incentivo, pelos conselhos, pelas longas conversas e troca de idéias. Tenho orgulho de tê-los como pais. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Aos meus queridos irmãos Rolando III e Ronaldo, obrigada por tudo! Desde a ajuda na resolução de problemas no computador, até o apoio, carinho, etc.

À minha avó Lucinda que colocou atenção e se esforçou para entender este trabalho, obrigada pelo apoio.

À toda família do Chile, que apesar da distância e de pouca comunicação, sempre recebi incentivos.

Às minhas amigas Ana Paula, Débora e Luciani, que também estão na mesma jornada que eu, mas em cursos diferentes. Obrigada pela amizade!

Aos amigos da Bio, Carlos, Fernanda Fadel, Fernanda Serena, Juliana, Maicon, Priscila, Tomas, obrigada pela convivência, desejo a todos vocês muito sucesso! Mesmo que nossos caminhos se distanciem espero que continuemos nos vendo!

Aos colegas de iniciação científica Amanda, Carolina, Daniel, Douglas, Lorena, Moira e Natalia. Desejo o melhor para todos vocês!

Aos colegas de laboratório Ana Helena, Andrea, Dirce, Elaine, Giovana, Lucimara, Fernanda, Fhernanda, Guilherme, Juliana, Lauro, Ricardo e Thales por toda ajuda, pela convivência, pelo apoio e pelo carinho.

À Elaine R. Carbonero pela coleta da goma utilizada neste trabalho.

Ao Prof. Guilherme Sasaki, pela realização das análises de RMN.

À Rosane e à Andréia pelas análises de GC, GC-MS e HPSEC-MALLS.

Ao Lauro, pelas análises de ESI-MS.

Ao CNPq e PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro durante a fase de iniciação científica.

Quero agradecer a todos que participaram, de alguma forma, para a realização deste trabalho. Obrigada!

## RESUMO

No Brasil a cultura do coqueiro vem alcançando significativo valor econômico, tanto na área alimentícia como na têxtil, pois praticamente todas as partes da planta são utilizadas. A caracterização estrutural da goma do exsudato que é liberado pela planta pode contribuir para trabalhos futuros de aplicações industriais, gerando outras fontes alternativas de renda para os produtores. Nesta pesquisa, a goma do coqueiro (*Cocos nucifera*) foi extraída sucessivamente com água a 25° C e 50° C dando origem às frações CNNF (9% de rendimento) e CNNQ (12% de rendimento), respectivamente. O resíduo obtido após extração aquosa foi submetido à extração alcalina com KOH 1% (m/v), a 25° C, originando a fração CNNAL (44% de rendimento). Esta fração apresentou-se homogênea por HPSEC-MALLS ( $M_w$   $3,05 \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup>) e composta por Fuc, Ara, Xyl e ácido urônico na proporção de 7:28:62:3, respectivamente. A análise de metilação mostrou uma estrutura complexa com terminais não redutores de Araf (11%), Arap e Xylp (18%) e Fucp (5%), unidades de Araf 3-O-substituídas (8%), unidades de Xylp 2-O- e 4-O- (16%), 3,4-di-O- (15%), 2,4-di-O- (5%) e 2,3,4-tri-O-substituídas (22%). O espectro de RMN-<sup>13</sup>C do CNNAL mostrou ~10 sinais na região anomérica, confirmando a complexidade estrutural. Os sinais em  $\delta$  108,6-107,0 referem-se às unidades de  $\alpha$ -L-Araf. Os sinais em  $\delta$  16,8-15,6 correspondem ao -CH<sub>3</sub> (C-6) das unidades de Fucp. A cadeia principal do CNNAL foi caracterizada através da análise do polissacarídeo obtido por degradação controlada de Smith (CNNAL-S; 25% de rendimento), que se mostrou composto por Ara, Xyl e ácido urônico na proporção molar de 13:85:2, respectivamente. A análise de metilação do CNNAL-S mostrou unidades de Xylp 4-O- (~56%), 2-O- (~18%) e 2,4-di-O-substituídas (16%), indicando uma cadeia principal de Xylp-(1→4)-ligadas. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C do CNNAL-S apresentou 5 sinais principais em  $\delta$  101,6,  $\delta$  75,5,  $\delta$  73,9,  $\delta$  72,5 e  $\delta$  63,1 que podem ser atribuídos ao C-1, C-4, C-3, C-2 e C-5 das unidades de Xylp  $\beta$ -(1→4) ligadas da cadeia principal. Após carboxi-redução do CNNAL foi obtida uma fração (CNNAL-CR2) que apresentou Glc e 4-Me-Glc (proporção 2:1) em sua composição, indicando que no polissacarídeo nativo (CNNAL) os componentes ácidos presentes eram GlcpA e 4-Me-GlcpA. Os resultados obtidos indicam que o polissacarídeo presente na goma do exsudato do coqueiro (*Cocos nucifera*) caracteriza-se como uma  $\beta$ -xilana ácida altamente substituída, similar aos polissacarídeos encontrados nas gomas de exsudatos de outras espécies de palmeiras. A fração oligo-D, isolada do sobrenadante etanólico, apresentou em sua composição, majoritariamente, Ara, Xyl e ácido urônico. Através da análise por RMN-<sup>13</sup>C observou-se a presença de sinais que podem ser atribuídos aos carbonos de unidades de Xylp  $\beta$ -(1→4) ligadas, sugerindo que carboidratos de baixa massa molecular com estruturas semelhantes à do polissacarídeo podem ser encontrados na goma estudada.

Palavras-chave: *Cocos nucifera*; goma de exsudato; polissacarídeo; estrutura.

## ABSTRACT

In Brazil the culture of coconut is reaching significant economic value, both in food as in textiles, because almost all parts of the plant are used. The structural characterization of the gum exudate which is released by the plant can contribute to future work in industrial applications, generating alternative sources of income for producers. In this research, the gum of the coconut (*Cocos nucifera*) was extracted successively with water at 25° C and 50° C to give fractions CNNF (9% yield) and CNNQ (12% yield), respectively. The residue obtained after extracting water was submitted to alkaline extraction with 1% aq. KOH, at 25° C, to give fraction CNNAL (44% yield), which was homogeneous on HPSEC-MALLS with  $M_w$   $3.05 \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup>. It was composed of Fuc, Ara, Xyl and uronic acid in a 7:28:62:3 molar ratio, respectively. The methylation analysis showed a complex structure with nonreducing end-units of Araf (11%), Arap and Xylp (18%) and Fucp (5%), 3-*O*-substituted Araf units (8%), 2-*O*- and 4-*O*- (16%), 3,4-di-*O*- (15%), 2,4-di-*O*- (5%) and 2,3,4-tri-*O*-substituted (22%) Xylp units. The <sup>13</sup>C-NMR spectrum of the CNNAL showed almost 10 signals in the anomeric region, confirming the structural complexity. The signals at  $\delta$  108.6-107.0 are from  $\alpha$ -L-Araf units. The signals at  $\delta$  16.8-15.6 were assigned to -CH<sub>3</sub> (C-6) of Fucp units. The main chain of CNNAL was characterized by analysis of a Smith-degraded polysaccharide (CNNALS - 25% yield), which was composed of Ara: Xyl and uronic acids in a 13:85:2 molar ratio, respectively. Methylation analysis of CNNAL-S showed 4-*O*- (~ 56%), 2-*O*- (~ 18%) and 2,4-di-*O*-substituted (16%) Xylp units, indicating  $\beta$ -(1→4)-Xylp main-chain. The <sup>13</sup>C-NMR spectrum of the CNNAL-S contained 5 main signals in  $\delta$  101.6,  $\delta$  75.5,  $\delta$  73.9,  $\delta$  72.5 and  $\delta$  63.1, that can be attributed to the C-1, C-4, C-3, C-2 and C-5 of units Xylp  $\beta$ -(1 → 4) linked to the main chain. The carboxyl-reduced polysaccharide (CNNAL-CR2) showed Glc and 4-Me-Glc (2:1 ratio) in its composition, indicating that the native polysaccharide (CNNAL) has GlcpA and 4-Me-GlcpA as acid compounds. The results indicate that the polysaccharide present in the gum exudate the coconut (*Cocos nucifera*) is a  $\beta$ -xylan acid highly substituted, similar to those founded in gum exudates of other species of palms. The fraction oligo-D, isolated from the ethanolic supernatant, is composed mainly of Ara, Xyl and uronic acid and its <sup>13</sup>C-NMR showed signals that can be attributed to carbons from Xylp  $\beta$ -(1 → 4)-linked units, suggesting the presence of free reducing oligosaccharides in gum exudate with structures similar to that of polysaccharide.

Keywords: *Cocos nucifera*; gum exudate; polysaccharide; structure.

“A arte de educar e formar a juventude é a arte das artes e a ciência das ciências”.

Greg. Naz.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - *Cocos nucifera*. A: ASPECTO GERAL DA ÁRVORE E DOS FRUTOS. B: PLANTAÇÃO DE COQUEIRO NA CIDADE DE BARRA DE SÃO MIGUEL, MACEIÓ .....14
- FIGURA 2 - ASPECTO GERAL DA GOMA DO EXSUDATO DE *Cocos nucifera* (COQUEIRO) .....14
- FIGURA 3 - METODOLOGIA UTILIZADA PARA A OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS CNNF, CNNQ, CNNAL.....14
- FIGURA 4 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO DEGRADADO (CNNAL) E DO POLISSACARÍDEO CARBOXI-REDUZIDO (CNNAL-CR2) .....14
- FIGURA 5 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA REGIÃO ANOMÉRICA DOS POLISSACARÍDEOS CNNF, CNNQ E CNNAL. ....14
- FIGURA 6 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO CNNAL POR HPSEC-MALLS UTILIZANDO OS DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (EL) EM VERMELHO E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) EM AZUL.....14
- FIGURA 7 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DO POLISSACARÍDEO CNNAL (EM D<sub>2</sub>O).....14
- FIGURA 8 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES CNNAL E CNNAL-S OBTIDO NO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO HPSEC.....14
- FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DO POLISSACARÍDEO CNNAL-S (EM Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>). .....14
- FIGURA 10 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO OLIGO-D APÓS HIDRÓLISE .....14
- FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO OLIGO-D (EM D<sub>2</sub>O).....14

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, DAS FRAÇÕES CNNF, CNNQ, CNNAL .....	32
TABELA 2 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO CNNAL.....	35
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES CNNAL, CNNAL-S E CNNAL-CR2 .....	38
TABELA 4 - ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES CNNAL, CNNAL-S E CNNAL-CR2.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$	- deslocamento químico
AgNO <sub>3</sub>	- nitrato de prata
Ara	- arabinose
BaCO <sub>3</sub>	- carbonato de bário
CH <sub>3</sub> I	- iodeto de metila
CNNAL	- polissacarídeo nativo obtido de extração alcalina
CNNAL-CR2	- polissacarídeo obtido por carboxi-redução, a partir da fração CNNAL
CNNAL-S	- polissacarídeo obtido por degradação controlada de Smith, a partir da fração CNNAL
CNNF	- polissacarídeo nativo obtido de extração aquosa a temperatura ambiente
CNNQ	- polissacarídeo nativo obtido de extração aquosa a quente
CuSO <sub>4</sub>	- Sulfato de cobre
D <sub>2</sub> O	- água deuterada
Da	- Daltons
$dn/dc$	- variação do índice de refração em relação à concentração
EtOAc	- acetato de etila
Fuc	- fucose
g	- gramas
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GLC	- cromatografia líquido-gasosa
Glc	- glucose
GlcA	- ácido glucurônico
h	- horas
H <sub>2</sub> O	- água
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- ácido sulfúrico
HOAc	- ácido acético
HPSEC-MALLS	- cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz
KOH	- hidróxido de potássio

m/m	- relação entre massa e massa
m/v	- relação entre massa e volume
m/z	- relação entre massa e carga
Me <sub>2</sub> SO	- dimetilsulfóxido
Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub>	- dimetilsulfóxido deuterado
MES	- ácido etanosulfônico-2-[N-morfolina]
mg	- miligrama
MHz	- mega Hertz
min	- minutos
ml	- mililitros
<i>M<sub>w</sub></i>	- massa molar média ponderal em massa
NaBH <sub>4</sub>	- boroidreto de sódio
NaIO <sub>4</sub>	- periodato de sódio
NaN <sub>3</sub>	- azida de sódio
NaNO <sub>2</sub>	- nitrito de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
Oligo-D	- oligossacarídeo livre redutor obtido do sobrenadante etanólico
p/v	- peso/volume
pH	- potencial hidrogeniônico
RMN- <sup>13</sup> C	- ressonância magnética nuclear de carbono-13
rpm	- rotações por minuto
R <sub>t</sub>	- tempo de retenção
SE-CNN	- sobrenadante etanólico das extrações aquosas a temperatura ambiente e a quente
TFA	- ácido trifluoracético
tr	- traços
TRIS	- Tris-(aminometilidenotrimetanol)
v	- volume
v/v	- volume/volume
Xyl	- xilose

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 JUSTIFICATIVA .....	15
1.2 OBJETIVO GERAL .....	16
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS GOMAS .....	17
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS GOMAS DE EXSUDATOS .....	18
2.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS UTILIZADOS INDUSTRIALMENTE .....	18
2.4 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE OUTRAS GOMAS DE EXSUDATOS .....	19
2.4.1 Gomas de exsudatos do grupo das xilanas altamente substituídas .....	20
2.5 <i>Cocos nucifera</i> .....	21
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 OBTENÇÃO DA GOMA .....	23
3.2 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO NATIVO .....	23
3.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS REALIZADAS NO POLISSACARÍDEO NATIVO OBTIDO DA GOMA DO COQUEIRO .....	24
3.3.1 Oxidação com periodato de sódio e degradação controlada de Smith .....	24
3.3.2 Carboxi-redução .....	26
3.4 ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS CARBOIDRATOS OBTIDOS .....	27
3.4.1 Análise de composição monossacarídica .....	27
3.4.2 Determinação de homogeneidade e massa molar ( $M_w$ ) .....	27
3.4.3 Análise de metilação .....	28
3.4.3.1 Hidrólise, redução e acetilação dos produtos per- <i>O</i> -metilados .....	28
3.4.4 Métodos analíticos .....	29
3.4.4.1 Cromatografia em papel analítica .....	29
3.4.4.2 Cromatografia em papel preparativa .....	29
3.4.4.3 Cromatografia em camada delgada (TLC) .....	30
3.4.4.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS) e cromatografia líquido-gasosa (GLC) .....	30

3.4.4.5	Análises de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ (RMN- $^{13}\text{C}$ ) .....	31
3.4.5	Métodos colorimétricos.....	31
3.4.5.1	Dosagem de ácidos urônicos .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>31</b>
4.1	POLISSACARÍDEO NATIVO DA GOMA DO COQUEIRO.....	31
4.2	POLISSACARÍDEO OBTIDO POR CARBOXI-REDUÇÃO .....	37
4.3	POLISSACARÍDEO OBTIDO POR DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH.....	37
4.4	OLIGOSSACARÍDEOS LIVRES PRESENTES NA GOMA DO COQUEIRO .....	40
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O termo goma é utilizado, de maneira geral, para definir moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas de alta massa molar que possuem propriedades coloidais (WHISTLER, 1973). Industrialmente são chamados de gomas os polissacarídeos obtidos de exsudatos de árvores, sementes, algas ou por fermentação microbológica. As gomas de exsudatos, que é objeto desse estudo, possuem como principais componentes os polissacarídeos e englobam as mais complexas estruturas vegetais conhecidas (ASPINALL, 1969).

As gomas possuem uma grande possibilidade de aplicações em diversos ramos industriais, como a da engenharia, biotecnologia e medicina e estão sendo muito investigadas nos últimos anos em relação às suas características físico-químicas e aplicações (EIRAS, *et al*, 2007).

Muitas das gomas de exsudatos encontradas na flora brasileira não foram estudadas nem com relação à estrutura química nem ao potencial biotecnológico e industrial. As gomas nacionais são potenciais substitutas para as gomas importadas, hoje amplamente utilizadas no Brasil, como é o caso da goma arábica, proveniente do Senegal e Sudão (África). O investimento do Brasil na importação de goma arábica é de aproximadamente \$ 1.900.000,00 por ano (BARBOSA, 2003). Felizmente, no mercado interno, esta goma já vem sendo substituída pela goma do cajueiro, que possui estrutura e propriedades físico-químicas muito semelhantes à da goma arábica (BARBOSA, 2003). Tal comercialização só ocorreu graças aos dados de pesquisa científica desenvolvida em universidades brasileiras que vislumbraram o potencial uso desta goma pela indústria.

Além disso, a utilização de gomas provenientes de árvores brasileiras pode ajudar a promover o desenvolvimento sustentável, gerando maiores possibilidades de renda para moradores locais. As gomas também poderiam consistir em um subproduto economicamente interessante em pomares do Brasil, uma vez que uma grande quantidade de árvores frutíferas está sujeita à exsudação de gomas (SIMAS, 2007).

Além do potencial econômico e industrial, foi observado que para gomas de espécies de palmeira, não pertencentes ao mesmo gênero, ocorria uma alta similaridade estrutural em seus polissacarídeos. Estas possuem uma cadeia

principal de  $\beta$ -D-Xylp (1→4) ligadas e, além disso, apresentam como característica comum a presença de  $\alpha$ -Fucp, sugerindo que, dentro da família Arecaceae, as gomas poderiam ser consideradas marcadores quimiotaxonômicos (MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003; SIMAS *et al.*, 2004; SIMAS *et al.*, 2006).

O coqueiro (*Cocos nucifera*), espécie de estudo desse trabalho, é uma palmeira pertencente à família Arecaceae (SIQUEIRA *et al.*, 2002) e é a única espécie classificada no gênero *Cocos*.

A produção brasileira de coco está distribuída por quase todo o território brasileiro, com exceção dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, devido às suas limitações climáticas durante parte do ano (EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 2007). O Brasil é o quarto maior produtor mundial, a Região Nordeste é o local onde se encontra a maior produção, sendo a Bahia, Pará, Ceará, Pernambuco e Espírito Santo, os cinco estados com maior produção (Agriannual, 2006).

A produção nacional de coco é de fundamental importância econômica e social para a região Nordeste (LINS, 2003), pois é de grande importância sócio-econômica na geração de emprego e renda, alimentação e na sustentabilidade. No Brasil, a cocoicultura gera emprego e renda para mais de 500 mil pessoas envolvidas diretamente no processo, além dos inúmeros empregos indiretos gerados ao longo da cadeia produtiva, nos setores secundário e terciário da economia (comércio, transportes, indústria de alimentos, insumos, têxtil, máquinas e equipamentos, embalagens, etc.) (EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 2007).

O objeto de estudo deste trabalho foi a goma de exsudato do coqueiro (*Cocos nucifera*), com enfoque na caracterização estrutural do polissacarídeo e dos oligossacarídeos que a compõem.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A realização deste trabalho pode ser justificada pelos seguintes aspectos:

- Há poucos estudos de gomas de exsudatos de árvores brasileiras;
- Escassez de estudos das gomas de exsudatos de plantas da família Arecaceae;

- Necessidade de se buscar gomas nacionais úteis à indústria, para substituir as gomas importadas;
- Com os estudos da goma do coqueiro seria possível incentivar o agronegócio, pois, geralmente, as gomas são descartadas nas plantações. Além das utilidades que o coqueiro já possui, o uso da goma pode ajudar no desenvolvimento sustentável aumentando o número de empregos, gerando uma fonte de renda alternativa e assim, trazer vantagens para os produtores.
- A característica estrutural do polissacarídeo que compõem a goma está envolvida com as características físico-químicas que vão gerar seu potencial econômico, assim o estudo da goma do coqueiro contribui para análises futuras de aplicações industriais e até mesmo biológicas;
- A caracterização estrutural do polissacarídeo e dos oligossacarídeos presentes na goma de *Cocos nucifera* vem contribuir para a análise comparativa das gomas de outras palmeiras já estudadas.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é obter e caracterizar estruturalmente o polissacarídeo e os oligossacarídeos presentes na goma do exsudato vegetal de *Cocos nucifera* (coqueiro) utilizando métodos químicos e espectroscópicos.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

1. Obter e purificar o polissacarídeo nativo da goma do exsudato de *Cocos nucifera*;
2. Analisar o polissacarídeo nativo quanto à sua homogeneidade por HPSEC-MALLS;
3. Submeter o polissacarídeo nativo aos procedimentos de carboxi-redução e degradação controlada de Smith;

4. Caracterizar estruturalmente o polissacarídeo nativo e os polissacarídeos obtidos por carboxi-redução e degradação controlada de Smith através de métodos químicos, espectroscópicos e espectrométricos;
5. Fracionar os oligossacarídeos livres redutores presentes na goma do coqueiro;
6. Caracterizar os oligossacarídeos através de métodos químicos, espectroscópicos e espectrométricos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS GOMAS

O termo goma, nome usado pela indústria, refere-se a polissacarídeos que se dissolvem totalmente ou parcialmente em água quente ou fria, formando soluções viscosas ou suspensões (BOTELHO, 1999).

As gomas de exsudatos são aquelas substâncias de origem vegetal exsudadas através dos galhos, troncos de árvores e até mesmo dos frutos. Elas podem ser produzidas espontaneamente como parte do metabolismo normal da planta ou, mais freqüentemente, podem estar envolvidas com algum mecanismo protetor do vegetal, liberando exsudação gomosa em resposta a injúria mecânica ou a invasão microbiana (JONES e SMITH, 1949; MARQUES e XAVIER-FILHO, 1991).

As gomas de exsudatos mais utilizadas pelas indústrias são a goma arábica, ghatthi, karaya e tragacanto. Elas podem ser utilizadas em diferentes indústrias devido, principalmente, às suas características viscosas ou até mesmo de geleificação. São utilizadas na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, de detergentes, têxtil, de adesivos, de papel, de tintas, entre outras aplicações (WHISTLER, 1993; RODRIGUES *et. al.*, 1993). São empregadas como agentes espessantes, geleificantes, emulsificantes, floculantes, clarificantes, encapsuladores, estabilizadores de espuma e suspensões, etc. (BeMILLER, 1987).

Os polissacarídeos presentes nas gomas estão entre as estruturas mais complexas dentre os polissacarídeos vegetais (ASPINALL, 1969) e tal complexidade se deve ao fato dos polissacarídeos possuírem vários componentes

monossacarídicos, diferentes tipos de ligações glicosídicas, anéis piranosídicos e furaranosídicos, e enantiômeros D e L (SIMAS, 2007).

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS GOMAS DE EXSUDATOS

A classificação das gomas de exsudatos tem sido realizada de acordo com as características físicas, químicas e físico-químicas. Em 1959, Smith e Montgomery propuseram uma classificação de acordo com as características físicas, como solubilidade, viscosidade e presença ou ausência de ácidos urônicos, de acordo com essa classificação as gomas de exsudatos estariam inclusas no grupo das gomas ácidas.

Outro critério que foi utilizado para a classificação foi baseando-se na estrutura química do heteropolissacarídeo. Aspinall (1969) classificou de acordo com a estrutura das cadeias internas dos polissacarídeos, onde as galactanas possuem a cadeia principal de galactose, onde está incluída a maioria das gomas de exsudatos. Stephen (1983) classificou de acordo com a estrutura total do heteropolissacarídeo presente na goma, dentro desta classificação, a maioria das gomas de exsudatos está inserida no grupo das arabinogalactanas substituídas.

## 2.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS UTILIZADOS INDUSTRIALMENTE

No grupo das arabinogalactanas está incluída a goma arábica, produzida pela espécie *Acacia Senegal*, pertencente à família Mimosaceae (DEFAYE e WONG, 1986), amplamente utilizada na indústria de alimentos e de tintas (WHISTLER, 1993). Esta apresentou em sua composição monossacarídica unidades de Rham, Ara, Gal e ácido urônico, formando uma cadeia principal de  $\beta$ -D-Galp ligada (1 $\rightarrow$ 3) com ligações (1 $\rightarrow$ 6) alternadas e cadeias laterais altamente ramificadas (SMITH, 1939; ANDERSON, *et. al.*, 1966a e b; DEFAYE e WONG, 1986; TISCHER, *et. al.*, 2002). Tischer, Gorin e Iacomini (2002) estudaram os oligossacarídeos livres

reduzidores da goma arábica, permitindo assim a caracterização mais detalhada da estrutura desta goma.

A goma ghatti (*Anogeissus latifolia*), que também é muito utilizada pela indústria, está incluída no grupo das glucuronomananas (ASPINALL, 1969). É composta por um heteropolissacarídeo com cadeia principal de  $\rightarrow 2$ - $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$  e com ramificações de L-Arap, D-Galp, L-Araf e D-GlcpA (ASPINALL, 1969; TISCHER *et. al.*, 2002).

Outra goma de importância comercial é a goma tragacanto (*Astragalus gummifer*) que é composta por uma arabinogalactana com cadeia principal composta majoritariamente por unidades de Galp (1 $\rightarrow$ 6) ligadas e por um componente ácido (ácido tragacântico) que apresenta cadeia principal composta por unidades de GalpA  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) ligadas com raras inserções de Rhap (STEPHEN, 1983).

#### 2.4 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE OUTRAS GOMAS DE EXSUDATOS

Estudos realizados com Angico Branco (*Anadenanthera colubrina*), também pertencente à família Mimosaceae, apresentou uma estrutura altamente complexa constituída por unidades de arabinose (64%), galactose (20%), ácido urônico (10%), ramnose (6%) e manose (1%), formada por uma cadeia principal composta de unidades de  $\beta$ -D-Galp ligadas (1 $\rightarrow$ 3), e com variados tipos de cadeias laterais (DELGOBO *et. al.*, 1999).

O polissacarídeo presente na goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*), também apresentou uma complexidade estrutural. Em estudos realizados por Menestrina *et. al.* (1998) o polissacarídeo foi caracterizado como uma heterogalactana ácida, composta por Rham (2%), Ara (4%), Xyl (1%), Gal (82%), Glc (6%), e ácido urônico (5%), com cadeia principal formada por unidades de galactose unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e substituídas em O-6 por cadeias laterais de  $\alpha$ -L-Rhap,  $\beta$ -D-GlcpA,  $\beta$ -D-Galp e  $\alpha$ -L-Araf.

A goma de *Vochysia lehmannii* (Quaruba), incluída no grupo das glucuronomananas, apresentou uma estrutura simplificada e pouco ramificada, possuindo em sua cadeia principal unidades de  $\alpha$ -D-Manp, substituída em O-2, e unidades de  $\beta$ -D-GlcpA, substituída em O-4, alternadas, podendo algumas unidades de manose estarem substituídas em O-3 por unidades de arabinofuranose ou arabinopiranosose e estas substituídas por unidades de glucopiranosose (WAGNER *et al.*, 2004).

Stoddart e Jones (1998) caracterizaram a goma do limão (*Citrus limonia*), família Rutaceae, como uma galactana altamente ramificada com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) dispostas de maneira não ordenada, com cadeias laterais de ramnose, arabinose e ácido urônico.

#### 2.4.1 Gomas de exsudatos do grupo das xilanas altamente substituídas

As gomas do grupo das xilanas altamente substituídas são polissacarídeos estruturalmente relacionados com as heteroxilanas e arabinoxilanas (hemiceluloses) de parede vegetal celular (ASPINALL, 1969) e possuem cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-Xylp (1 $\rightarrow$ 4) ligadas. Poucos exemplos de gomas deste grupo foram descritos na literatura.

White, (1953a,b, 1954) e Lambert *et al.*, 1968) estudaram a goma de *Sapota achras* (família Sapotaceae) e verificaram que o polissacarídeo presente se tratava de uma heteroxilana com cadeia principal de  $\beta$ -D-Xylp (1 $\rightarrow$ 4) ligadas com terminais não redutores de Arap, Araf, Xylp, GlcpA e 4-Me-GlcpA.

Dentro da família Fabaceae, polissacarídeos de gomas de duas espécies foram estudados e mostraram, ambos, cadeia principal de unidades de Xyl ligadas (1 $\rightarrow$ 4). Na espécie *Cercidium australe* a cadeia principal mostrou-se altamente substituída por unidades de D-Xylp, L-Arap e ácidos urônicos (CEREZO, *et al.*, 1969). e em *Cercidium praecox* foi verificada a presença de 4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA,  $\alpha$  e  $\beta$ -D-GlcpA,  $\alpha$ -L-Araf e  $\beta$ -L-Arap fazendo parte das cadeias laterais. (LÉON DE PINTO, *et al.*, 1994).

Gomas de exsudatos de três espécies de palmeiras (Arecaceae) foram detalhadamente estudadas no laboratório de Química de carboidratos de exsudatos vegetais - UFPR: a goma de *Livistona chinensis* (Leque-chinês) (MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003), de *Scheelea phalerata* (Uricuri) (SIMAS *et al.*, 2004) e de *Syagrus romanzoffiana* (Jerivá) (SIMAS *et al.*, 2006). Seus polissacarídeos são muito semelhantes e caracterizam-se como heteroxilanas ácidas com cadeia principal de xilose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). As cadeias laterais são compostas por 4-Me- $\alpha$ -D-GlcpA,  $\alpha$ -D-GlcpA,  $\alpha$ -L-Araf, L-Arap,  $\beta$ -D-Xyl e L-Fucp.

Observações feitas na estrutura dos polissacarídeos das gomas de plantas dicotiledôneas mostraram que geralmente existem variações entre a composição química de várias espécies, dentro do mesmo gênero, principalmente em relação às cadeias laterais (SMITH e MONTGOMERY, 1959). O que foi observado para as gomas de algumas espécies de palmeiras (monocotiledôneas), não pertencentes ao mesmo gênero, foi uma semelhança estrutural em seus polissacarídeos, pois além de apresentarem a cadeia principal composta de unidades  $\beta$ -Xylp (1 $\rightarrow$ 4) ligadas, também apresentaram a característica comum de possuírem unidades de  $\alpha$ -Fucp. Esta similaridade estrutural dos polissacarídeos presentes nas gomas de exsudatos de espécies de palmeiras sugere que estes podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos (SIMAS, 2004). Desta forma, a análise estrutural da goma do coqueiro (*Cocos nucifera*), que será realizada neste trabalho, vem contribuir para tal análise comparativa.

## 2.5 *Cocos nucifera*

*Cocos nucifera* é uma palmeira pertencente à família Arecaceae (Figura 1), é a única espécie classificada no gênero *Cocos*. Conhecido popularmente como Coqueiro, coqueiro-da-Índia, coco-da-baía, coqueiro-anão, é uma planta essencialmente tropical, encontrando condições climáticas favoráveis entre as latitudes 20°N e 20°S, portanto encontra-se distribuído por quase todo o território nacional.

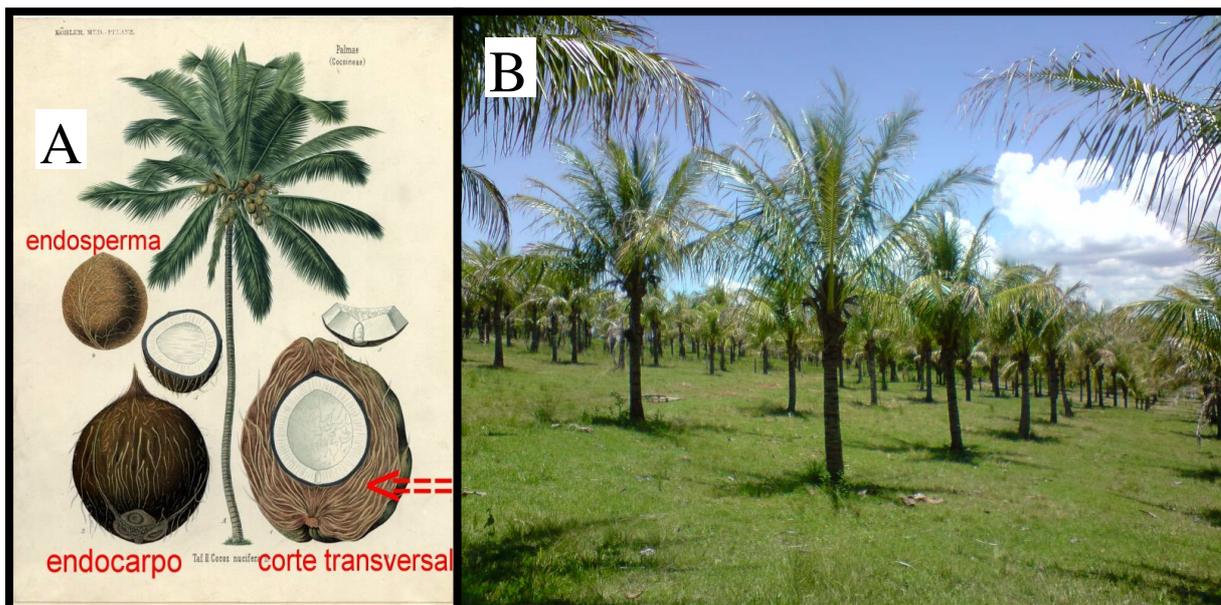


FIGURA 1 - *Cocos nucifera*. A: ASPECTO GERAL DA ÁRVORE E DOS FRUTOS. B: PLANTAÇÃO DE COQUEIRO NA CIDADE DE BARRA DE SÃO MIGUEL, MACEIÓ

(Fonte: Kuhler Med Plants e Risoleta Cardoso, 2007)

O coqueiro é uma planta arbórea com copa densa, que apresenta contínuo florescimento e frutificação ao longo do ano. O caule é do tipo estipe, com tufo de folhas do tipo penada, bem verdes na extremidade. A inflorescência é a única ramificação do caule, e o fruto é do tipo drupa (FERRI, 1973).

Pode-se dizer que do coqueiro tudo se aproveita, é útil pela enorme variedade de produtos obtidos das diversas partes da planta (PEDROSO, *et al.*, 2007). Do coco é extraído a polpa, o óleo, o leite de coco, a farinha, a água de coco, etc. O tronco fornece madeira para construção, as folhas fornecem materiais para cestas e palha de telhado, da casca do fruto se extrai a fibra que é empregada em estofamentos de veículos, enchimento de colchões, tapeçaria, cordoaria e fábrica de pincéis, e partes da planta são utilizadas também para produzir ração animal, combustíveis, bebidas, etc. (SIQUEIRA *et al.*, 2002).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DA GOMA

A goma de exsudato de *Cocos nucifera* (coqueiro), foi obtida no município de Águas de Santa Bárbara, localizado no interior do Estado de São Paulo nas coordenadas geográficas de Latitude 22°52' Sul e Longitude 49°15' Oeste (Fonte: IBGE). A goma foi gentilmente cedida, para o laboratório de Química de carboidratos de exsudatos vegetais – UFPR, pela Dra. Elaine Rosechrer Carbonero. O aspecto geral da goma está ilustrado na Figura 2.



FIGURA 2 - ASPECTO GERAL DA GOMA DO EXSUDATO DE *Cocos nucifera* (COQUEIRO)

#### 3.2 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO NATIVO

A goma bruta de *Cocos nucifera* (9,0 g) foi submetida à extração aquosa (1,5%, m/v), em temperatura ambiente, sob agitação magnética durante 16 h. A dispersão resultante foi filtrada, sendo que o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório até pequeno volume sendo então submetido à precipitação etanólica (3 x v). O precipitado obtido após centrifugação foi dialisado contra água corrente

durante 24 h e depois liofilizado, gerando o polissacarídeo nativo (CNNF, 9% de rendimento).

Os resíduos da extração aquosa a temperatura ambiente foram extraídos com água a 50° C sob agitação magnética “overnight”. A dispersão foi novamente filtrada, concentrada em evaporador rotatório e o filtrado foi adicionado de etanol em excesso (3 x v). O precipitado obtido foi dialisado contra água corrente durante 24 h e depois liofilizado, gerando o polissacarídeo nativo obtido após extração aquosa a quente (CNNQ, 12% de rendimento).

O material insolúvel da extração a quente foi submetido à extração alcalina com KOH 1% (m/v), juntamente com NaBH<sub>4</sub> para proteger as pontas reductoras dos polissacarídeos. Esta solução permaneceu sob agitação até a total solubilização, a temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado ácido acético glacial até alcançar o pH 5,0. A solução obtida foi concentrada em evaporador rotatório até pequeno volume e foi submetida à precipitação etanólica (3 x v). O precipitado obtido, após diálise contra água corrente, foi liofilizado, originando o polissacarídeo nativo obtido após extração alcalina (CNNAL, 44% de rendimento). Os sobrenadantes etanólicos obtidos nas extrações aquosas (temperatura ambiente e a quente) foram reunidos e, após redução de volume e liofilização, denominados de SE-CNN. O esquema geral de obtenção dos polissacarídeos nativos está representado na Figura 3.

### 3.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS REALIZADAS NO POLISSACARÍDEO NATIVO OBTIDO DA GOMA DO COQUEIRO

#### 3.3.1 Oxidação com periodato de sódio e degradação controlada de Smith

Este procedimento foi realizado segundo Dyer (1956), Goldstein *et al.* (1965), Hay *et al.* (1965) e Gorin *et al.* (1965). O polissacarídeo CNNAL (1,0 g), previamente solubilizado em água (100 ml), foi oxidado com 100 ml de metaperiodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>, 0,1 M). A solução permaneceu sob constante agitação durante 72 horas, no escuro. A reação foi interrompida com adição de

etilenoglicol e dialisada. Posteriormente, o material foi reduzido com  $\text{NaBH}_4$  ("overnight"), neutralizado com ácido acético a 50 % (v/v) e dialisado contra água corrente. O poliálcool resultante foi submetido à hidrólise ácida parcial em pH 2,0 (ajustado com TFA 0,1 M), sob refluxo fervente ( $\sim 96^\circ\text{C}$ ), por 40 minutos. Após neutralização, etanol em excesso foi adicionado à solução. O precipitado obtido (CNNAL-S; rendimento 25%) corresponde ao polissacarídeo degradado.

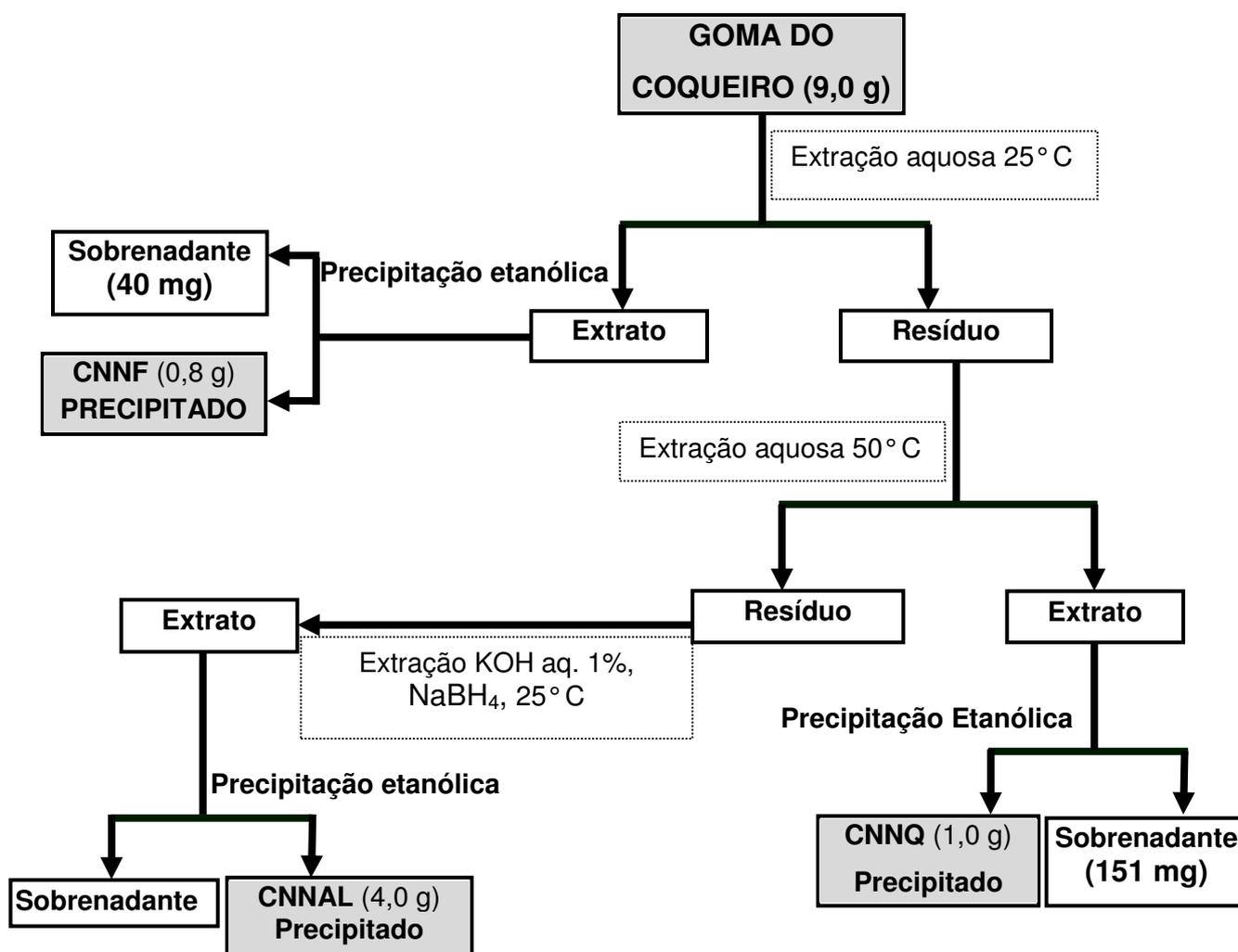


FIGURA 3 - METODOLOGIA UTILIZADA PARA A OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS CNNF, CNNQ, CNNAL

### 3.3.2 Carboxi-redução

O polissacarídeo CNNAL (200 mg) foi submetido a dois ciclos consecutivos de carboxi-redução (TAYLOR e CONRAD, 1972) (ESQUEMA 1) com o objetivo de reduzir os grupos carboxila (-COOH) dos seus ácidos urônicos, transformando-os nos açúcares neutros correspondentes, contendo grupos de -CH<sub>2</sub>OH, possibilitando assim, a verificação do tipo de ácido urônico presente na amostra. O polissacarídeo foi solubilizado em tampão MES (ácido 2-*N*-morfolino etano sulfônico) 0,2M, pH 4,75 (2 ml) e adicionado de carbodiimida [ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida] (0,144 mg). A solução permaneceu sob agitação magnética durante 1 hora. Decorrido este tempo, o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de 1 ml de tampão TRIS/HCl (2M; pH 7,0; amino metilideno trimetanol). Essa solução foi então reduzida com NaBH<sub>4</sub> (de maneira a perfazer uma concentração de 2 M na solução) durante 16 h, neutralizada com ácido acético e dialisada (*cut-off* de 8.000 Da) contra água corrente. A fração retida, CNNAL-CR2 (170 mg), foi concentrada, congelada e liofilizada. A Figura 4 mostra esquematicamente o processo descrito nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

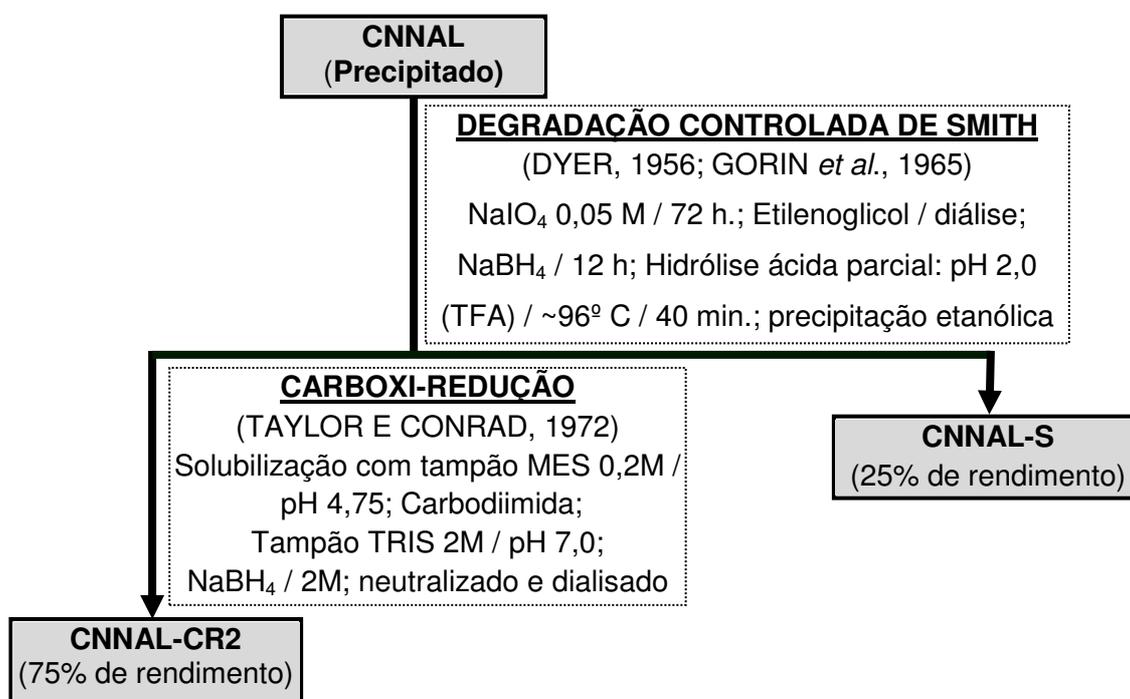


FIGURA 4 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO DEGRADADO (CNNAL) E DO POLISSACARÍDEO CARBOXI-REDUZIDO (CNNAL-CR2)

### 3.4 ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS CARBOIDRATOS OBTIDOS

#### 3.4.1 Análise de composição monossacarídica

Para análise da composição monossacarídica, as amostras (~2 mg) foram hidrolisadas com TFA 2M, durante 8 horas, a 100° C (GORIN *et al*, 1996). Após a hidrólise o TFA foi removido por evaporação. Na sequência o material resultante foi solubilizado em pequeno volume de água, sendo uma alíquota reservada para cromatografia em papel analítica. A outra parte foi submetida à redução com NaBH<sub>4</sub>, “overnight”, em temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). A solução foi então adicionada de resina catiônica (forma H<sup>+</sup>) até pH 4,0 para remoção de íons sódio, filtrada e levada à secura em evaporador rotatório. Posteriormente foi tratada exaustivamente com metanol.

Os derivados alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1 v/v), por 12 horas, em temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). A reação foi interrompida pela adição de gelo moído ao sistema. Os alditóis acetatos formados foram extraídos com clorofórmio, sendo que o ácido acético formado e a piridina foram removidos pelas sucessivas lavagens da fase clorofórmica com solução aquosa de CuSO<sub>4</sub> a 3% (p/v). A fase orgânica foi evaporada e as amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso acoplado ou não a espectrômetro de massa (GC-MS ou GLC, respectivamente).

#### 3.4.2 Determinação de homogeneidade e massa molar ( $M_w$ )

A análise de homogeneidade e a determinação da massa molar das amostras foram realizadas em HPSEC-MALLS, que utiliza um cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC), modelo WATERS 2410 e um detector de índice de refração conectado em série com um detector de espalhamento de luz (modelo Dawn DSP-F, Wyatt Technologies Corporation, EUA). Foram utilizadas quatro colunas ultrahydrogel WATERS dispostas de forma seqüencial e apresentando diferentes

limites de exclusão: 2000 ( $7 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>), 500 ( $4 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>), 250 ( $8 \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup>) e 120 ( $5 \times 10^3$  g.mol<sup>-1</sup>). As amostras foram solubilizadas em NaNO<sub>2</sub> 0,1 M (nitrito de sódio) contendo NaN<sub>3</sub> (azida de sódio) a 0,02%, na concentração de 1 mg.ml<sup>-1</sup>, filtradas em membrana de acetato de celulose MILLIPORE com diâmetro médio dos poros de 0,22 µm. Para o cálculo da massa molar, a amostra CNNAL teve seu valor de  $dn/dc$  determinado, sendo de 0,177. Para esta análise a fração foi solubilizada em cinco diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg.ml<sup>-1</sup>) e cada uma das soluções foi analisada pelo detector de índice de refração. Os cálculos de  $dn/dc$  e da massa molar foram realizados utilizando o software ASTRA 4.70.07.

### 3.4.3 Análise de metilação

A metilação dos polissacarídeos foi realizada pelo método descrito por Ciucanu e Kerek (1984), onde aproximadamente 10 mg da amostra foram solubilizadas em 2 ml de dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO), adicionadas de NaOH pulverizada (em excesso) e de 2 ml de iodeto de metila (CH<sub>3</sub>I). A mistura reacional permaneceu sob agitação durante 30 minutos e posteriormente, foi mantida em repouso durante 20 horas. Decorrido este tempo, a reação foi interrompida pela adição de água em banho de gelo, a solução foi neutralizada com ácido acético, e a amostra metilada foi extraída com clorofórmio.

#### 3.4.3.1 Hidrólise, redução e acetilação dos produtos per-O-metilados

Os produtos O-metilados foram hidrolisados segundo a metodologia de Saeman *et al.* (1954). O material resultante da metilação foi, primeiramente, pré-hidrolisado com 0,5 ml de ácido sulfúrico 50% (v/v) durante 1 hora em banho de gelo. Posteriormente, o ácido sulfúrico foi diluído com 4 ml de água para uma concentração de 1M e a amostra foi hidrolisada durante 16 h a 100° C. Após a hidrólise, a solução resultante foi neutralizada com carbonato de bário (BaCO<sub>3</sub>),

reduzida com borohidreto de sódio deuterado ( $\text{NaBD}_4$ ) (“overnight”) e acetilada conforme descrito no item 4.4. Os alditóis acetatos parcialmente metilados obtidos foram analisados por GC-MS.

#### 3.4.4 Métodos analíticos

##### 3.4.4.1 Cromatografia em papel analítica

As cromatografias em papel analíticas foram feitas com as amostras hidrolisadas, para acompanhar a hidrólise e verificar qualitativamente a composição monossacarídica. Com o intuito de verificar a presença de oligossacarídeos livres redutores na goma, o sobrenadante etanólico (SE-CNN) foi cromatografado. As cromatografias foram desenvolvidas pelo método descendente utilizando papel de filtro Whatman 1MM e tempo de corrida de 24 horas. Como fase móvel foi utilizado o solvente *n*-butanol:piridina: $\text{H}_2\text{O}$  5:3:3 ou 1:1:1 (v/v) e a revelação foi realizada com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$  saturada em acetona 1:1000 v/v) e hidróxido de sódio (NaOH 40% p/v em etanol 1:250 v/v), de acordo com o método descrito por Trevelyan, Procter e Harrison (1950).

##### 3.4.4.2 Cromatografia em papel preparativa

A fração SE-CNN foi fracionada em cromatografia preparativa em papel Whatman 3MM, utilizando como fase móvel o solvente *n*-butanol:piridina:  $\text{H}_2\text{O}$  1:1:1 (v/v). Após a corrida, apenas duas tiras laterais de 2 cm de largura foram reveladas (item 3.4.5.1). As bandas de interesse foram recortadas e suspensas em água, com o intuito de retirar os oligossacarídeos presentes no papel. O papel filtro foi retirado por centrifugação e a fase aquosa contendo os oligossacarídeos foi liofilizada.

#### 3.4.4.3 Cromatografia em camada delgada (TLC)

As amostras purificadas por cromatografia preparativa foram analisadas por cromatografia em camada delgada (TLC), utilizando como solvente EtOAc:*n*-PrOH:HOAc:H<sub>2</sub>O na relação 4:2:2:1 (v/v) e como revelador orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100° C.

#### 3.4.4.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS) e cromatografia líquido-gasosa (GLC)

Os componentes monossacarídicos foram quantificados através de cromatógrafo gasoso VARIAN, modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massa SATURN 2000R-*mass spectroscopy detector Ion Trap* (GC-MS). A coluna utilizada para a fração CNNAL-S parcialmente metilada foi a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 d.i. x 0,25 µm de espessura de filme). Durante a injeção da amostra a temperatura inicial da coluna foi mantida a 50° C por 0,1 minuto e então foi programada para aumentar 40° C.min<sup>-1</sup> até atingir a temperatura constante de 220° C (para análise de alditol acetato) ou 215° C (para análise de alditol acetato parcialmente *O*-metilado).

Para as frações CNNAL e CNNAL-CR2 parcialmente metiladas a coluna utilizada foi a CPSIL-5CB. A temperatura utilizada foi de 50° C durante a injeção da amostra e então programado para aumentar 20° C por minuto até atingir temperatura constante de 90° C. Posteriormente foi programado para aumentar 5° C por minuto até atingir 280° C. Foi utilizado Hélio ultrapuro como gás de arraste, a um fluxo de 1,5 ml/min.

Algumas frações foram analisadas em cromatógrafo gasoso TRACE GC ULTRA (Thermo Electron Corporation), coluna capilar DB-225, com detector por ionização de chama (FID) e temperaturas de 250 e 300° C para o injetor e o detector, respectivamente. As análises em GC-MS e GLC serão precedidas de hidrólise ácida total da amostra, redução e acetilação (item 4.6.1).

#### 3.4.4.5 Análises de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ (RMN- $^{13}\text{C}$ )

As análises de RMN- $^{13}\text{C}$  foram obtidas pelo uso de espectrômetro BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance. As amostras foram solubilizadas em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou  $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$  e as análises foram realizadas a  $30^\circ\text{C}$ , os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm, baseando-se no padrão interno de acetona ( $\delta$  30,0).

#### 3.4.5 Métodos colorimétricos

##### 3.4.5.1 Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácido urônico foi realizada através do método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Em uma alíquota 400 $\mu\text{l}$  de amostra foram adicionados 40 $\mu\text{l}$  de solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) e, em seguida, 2,4 ml de uma solução de tetraborato de sódio 75 mM em ácido sulfúrico. Os tubos contendo a mistura foram aquecidos em “banho maria” fervente durante 20 minutos. Após o resfriamento foram adicionados 80  $\mu\text{l}$  do reativo de cor, *m*-hidroxibifenila 0,15% (p/v) em NaOH 0,5% (p/v). A coloração obtida na presença de ácido urônico é lida no comprimento de onda de 525 nm e a sensibilidade do método é de 0,97 a 38,8  $\mu\text{g}$  de ácido urônico. Ácido glucurônico foi utilizado como padrão.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 POLISSACARÍDEO NATIVO DA GOMA DO COQUEIRO

As frações obtidas das extrações aquosas (CNNF e CNNQ) e da extração alcalina (CNNAL) da goma foram comparadas quanto ao rendimento, à composição monossacarídica e RMN-<sup>13</sup>C. CNNF, CNNQ e CNNAL foram obtidos rendimentos de 9%, 11% e 44%, respectivamente (em relação ao peso seco da goma). Com relação à composição monossacarídica as frações CNNF, CNNQ e CNNAL apresentaram, fucose, arabinose, xilose e ácido urônico (dosado colorimetricamente) na proporção molar de 6:32:59:3, 4:32:60:4 e 7:28:62:3, respectivamente (Tabela 1), sugerindo a presença de estruturas semelhantes, provavelmente arabinoxilanas. Verifica-se que a composição monossacarídica do polissacarídeo da goma de *Cocos nucifera* é semelhante à dos polissacarídeos de gomas de outras palmeiras já estudadas (MAURER-MENESTRINA *et.al.*, 2003; SIMAS *et. al.*, 2004, SIMAS *et al.*, 2006), sendo uma característica única para os polissacarídeos de gomas desta família a presença de fucose.

A similaridade estrutural entre as três frações foi confirmada pelos seus espectros de RMN-<sup>13</sup>C, como pode ser observado na Figura 5, que mostra a região anomérica de cada um deles.

Uma vez observada essa similaridade, a fração de maior rendimento, CNNAL, foi escolhida para a realização das análises subseqüentes e foi denominada de polissacarídeo nativo.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, DAS FRAÇÕES CNNF, CNNQ, CNNAL

Polissacarídeos	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%) <sup>a</sup>					
	Fuc	Ara	Xyl	4-Me-Glc	Glc	Ácido Urônico <sup>b</sup>
CNNF	6	32	59	-	-	3
CNNQ	4	32	60	-	-	4
CNNAL	7	28	62	-	-	3

<sup>a</sup> Percentual relativo de monossacarídeos; <sup>b</sup> O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991.

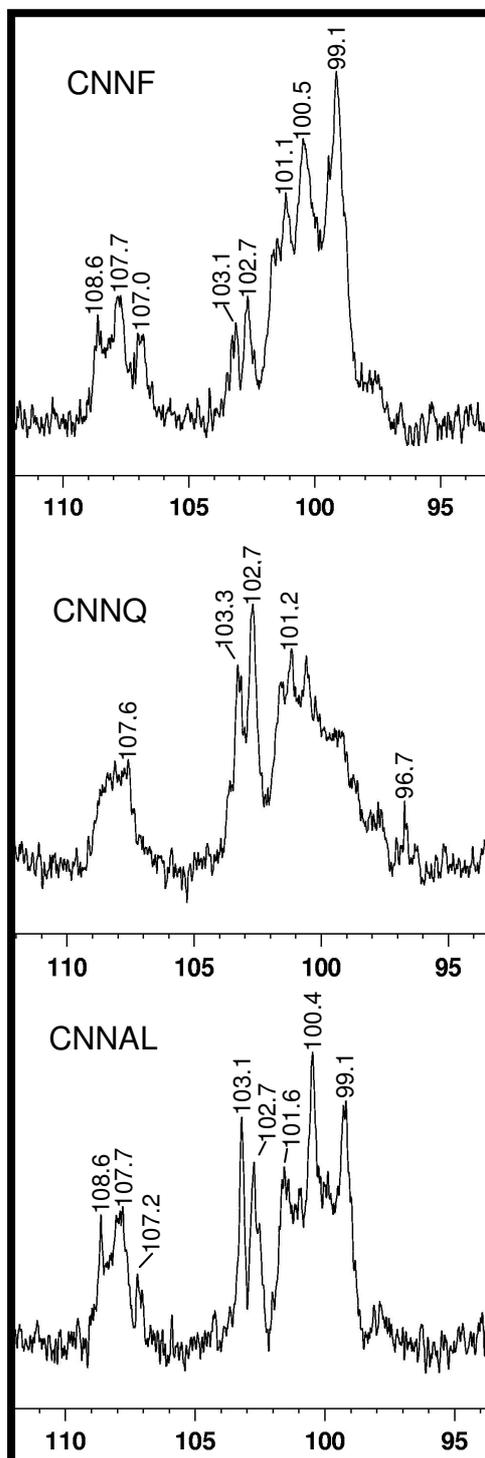


FIGURA 5 - ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA REGIÃO ANOMÉRICA DOS POLISSACARÍDEOS CNNF, CNNQ E CNNAL.

Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  ppm, baseando-se no padrão interno de acetona ( $\delta$  30,2). Solvente  $\text{D}_2\text{O}$  a  $30^\circ\text{C}$

A fração CNNAL foi submetida à análise por HPSEC-MALLS (Figura 6), sendo analisada quanto à homogeneidade e massa molar, e apresentou um perfil homogêneo, com a presença de um único pico detectado pelo índice de refração e pelo espalhamento de luz. A massa molar média ponderal em massa ( $M_w$ ) encontrada foi de  $3,05 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ , com  $dn/dc$  igual a 0,177. Esse valor de massa é baixo quando comparado com as massas molares de polissacarídeos encontrados em gomas de exsudatos de palmeiras como a goma de *Livistona chinensis* ( $M_w 1,9 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ ) (MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003), de *Scheelea phalerata* ( $M_w 1,04 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ ) (SIMAS *et al.*, 2004) e de *Syagrus romanzoffiana* ( $M_w 1,4 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ ) (SIMAS *et al.*, 2006).

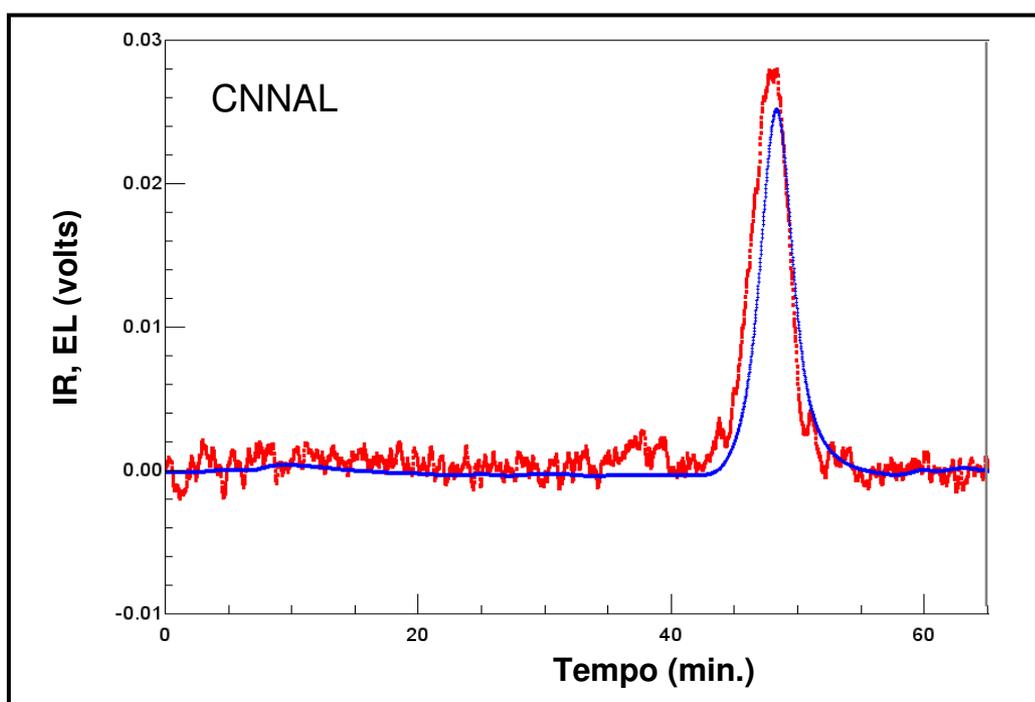


FIGURA 6 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO CNNAL POR HPSEC-MALLS UTILIZANDO OS DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (EL) EM VERMELHO E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) EM AZUL.

A análise de metilação do polissacarídeo CNNAL (Tabela 2) mostrou uma estrutura complexa com terminais não redutores de *Araf* (11%), *Arap* e *Xylp* (18%) e *Fucp* (5%), unidades de *Araf* 3-*O*-substituídas (8%), unidades de *Xylp* 2-*O*- e 4-*O*- (16%), 3,4-di-*O*- (15%) e 2,4-di-*O*- (5%) e 2,3,4-tri-*O*-substituídas (22%).

TABELA 2 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO CNNAL

Alditóis acetatos parcialmente <i>O</i> -metilados <sup>a</sup>	Tipo de ligação correspondente	R <sub>t</sub> (min.) <sup>b</sup>	Polissacarídeo (%)
			CNNAL
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	<i>Araf</i> -(1→	8.28	11
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara 2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	<i>Arap</i> -(1→ <i>Xylp</i> -(1→	9.01	18
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Fuc	<i>Fucp</i> -(1→	9.08	5
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	→3)- <i>Araf</i> -(1→	10.24	8
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl <sup>c</sup>	→4)- <i>Xylp</i> -(1→	10.99	3
3,4-Me <sub>2</sub> -Xyl <sup>c</sup>	→2)- <i>Xylp</i> -(1→	10.99	13
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	<i>Glc</i> -(1→	11.80	-
2-Me-Xyl	→3, 4)- <i>Xylp</i> -(1→	12.75	15
3-Me-Xyl	→2, 4)- <i>Xylp</i> -(1→	12.80	5
Xyl	→2, 3, 4)- <i>Xylp</i> -(1→	14.78	22

<sup>a</sup> Metilação realizada segundo Ciucanu e Kerek (1984). Após metilação, os derivados foram hidrolisados pelo método descrito por Saeman *et al.* (1954), reduzidos (NaBD<sub>4</sub>) e acetilados; <sup>b</sup> Tempo de retenção (min.) dos derivados metilados em coluna CPSIL-5CB a 280 °C; <sup>c</sup> Valores aproximados obtidos por comparação dos íons de *m/z* 118 e 129 (isômero 2,3-) com aqueles de *m/z* 117 e 130 (isômero 3,4-).

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C do polissacarídeo CNNAL (Figura 7) mostrou cerca de 10 sinais na região anomérica, confirmando a complexidade estrutural verificada pela análise de metilação. Os sinais em δ 108,6-107,0 referem-se às unidades de α-*L*-*Araf* (DELGOBO *et al.*, 1999, SIMS e FURNEAUX, 2003), os sinais em δ 103,1 e δ 101,6 referem-se às unidades de α-*Arap* e β-*Xylp*, respectivamente, e os sinais em δ 100,5-99,2 podem ser atribuídos a α-*Fucp* e α-*Glc*pA (GORIN e MAZUREK, 1975;

LÉON de PINTO, *et al.*; 1994). Na região de campo mais alto, os sinais em  $\delta$  84,3 e  $\delta$  76,7 podem ser atribuídos ao C-4 das unidades de  $\alpha$ -L-Araf e C-4 ligado das unidades de  $\beta$ -Xylp, respectivamente. Os sinais em  $\delta$  65,1,  $\delta$  63,0, e  $\delta$  61,4 podem ser atribuídos ao C-5 de terminais não redutores e unidades de Xylp (1 $\rightarrow$ 2)-ligadas, Xylp (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas e  $\alpha$ -L-Araf, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1998; LÉON de PINTO *et al.*, 1994; MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003; SIMS e FURNEAUX, 2003). Sinais em  $\delta$  16,8-15,6 correspondem ao  $-\text{CH}_3$  (C-6) das unidades de Fucp (ASPINALL *et al.*, 1991; MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003).

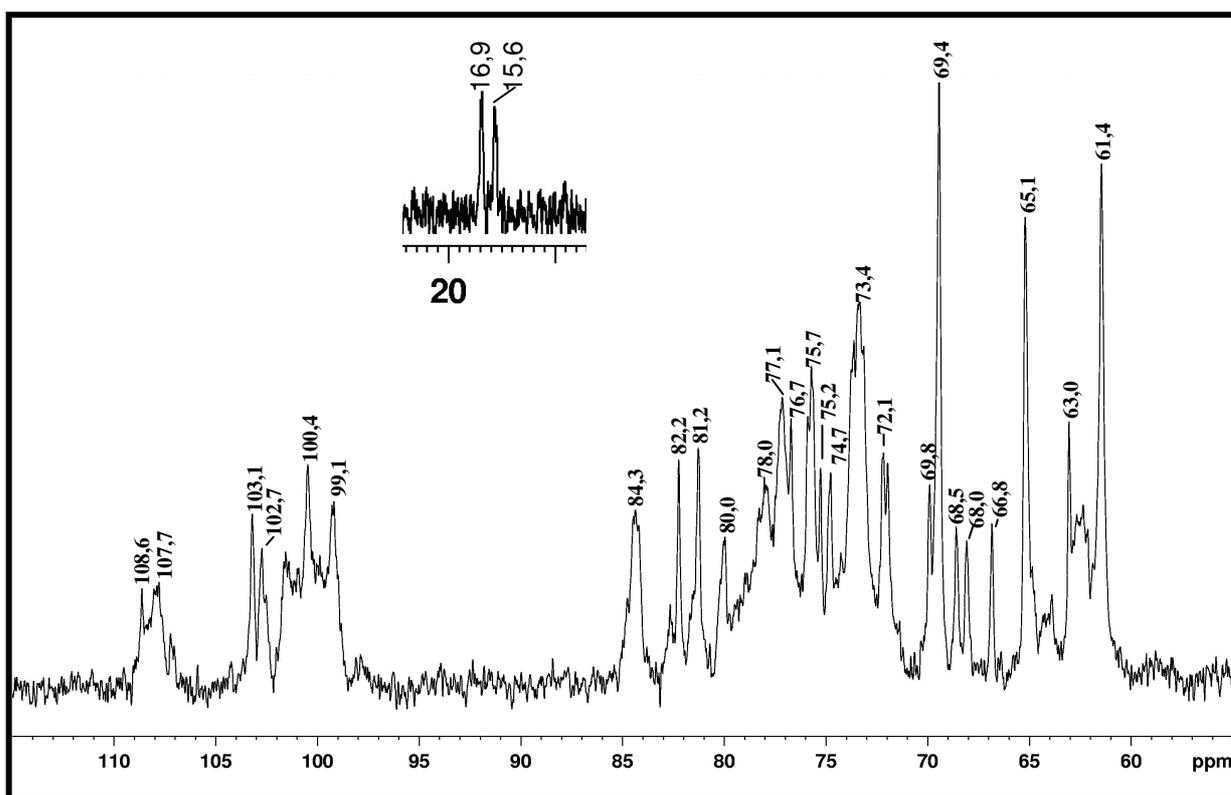


FIGURA 7 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DO POLISSACARÍDEO CNNAL (EM D<sub>2</sub>O).

Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  ppm, baseando-se no padrão interno de acetona ( $\delta$  30,2). No inserto, região de  $-\text{CH}_3$

## 4.2 POLISSACARÍDEO OBTIDO POR CARBOXI-REDUÇÃO

Com o intuito de verificar o tipo de ácido urônico presente no polissacarídeo nativo, este foi submetido a dois ciclos consecutivos de carboxi-redução obtendo-se o polissacarídeo carboxi-reduzido (CNNAL-CR2). O CNNAL-CR2 é constituído por Fuc, Ara, Xyl, 4-Me-Glc, e Glc, em uma proporção molar de 9:31:57:1:2, respectivamente (Tabela 3, página 38). Este dado indicou que o polissacarídeo CNNAL apresenta, como componentes ácidos, Glc $\alpha$ A e 4-Me-Glc $\alpha$ A.

Na análise de metilação do CNNAL-CR2 (Tabela 4, página 40) pode-se destacar a presença do derivado 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc (4%) correspondente a terminais não redutores de glucose. Este resultado indica que os ácidos urônicos (GlcA e 4-Me-GlcA) presentes no CNNAL posicionam-se em terminais não redutores.

## 4.3 POLISSACARÍDEO OBTIDO POR DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

Com o objetivo de se obter informações sobre a cadeia principal do polissacarídeo, a fração CNNAL foi submetida a um ciclo de degradação controlada de Smith gerando a fração CNNAL-S (rendimento 25%), homogênea por HPSEC (Figura 8). Conforme esperado, comparando-se o tempo de retenção desta amostra com o CNNAL pode-se sugerir que se trata de uma molécula menor.

A fração CNNAL-S mostrou-se composta por Ara, Xyl e ácido urônico na proporção molar de 13:85:2, respectivamente (Tabela 3, página 38), sugerindo a presença de uma arabinoxilana com uma estrutura mais simplificada do que a do polissacarídeo nativo (CNNAL).

A análise de metilação do polissacarídeo CNNAL-S (Tabela 4, página 40) mostrou grande proporção de unidades de Xyl $\beta$  4-O- (~56%), 2-O- (~18%) e 2,4-di-O-substituídas (16%), indicando uma cadeia principal de Xyl $\beta$  (1→4) ligadas. Verifica-se também que o procedimento de degradação controlada de Smith eliminou as unidades de fucose e diminuiu consideravelmente as unidades de arabinose no polissacarídeo. As unidades de arabinose ainda presentes como

terminais não redutores (10%) são provenientes das cadeias laterais 3-O-ligadas presentes no CNNAL e que são resistentes à oxidação do periodato.

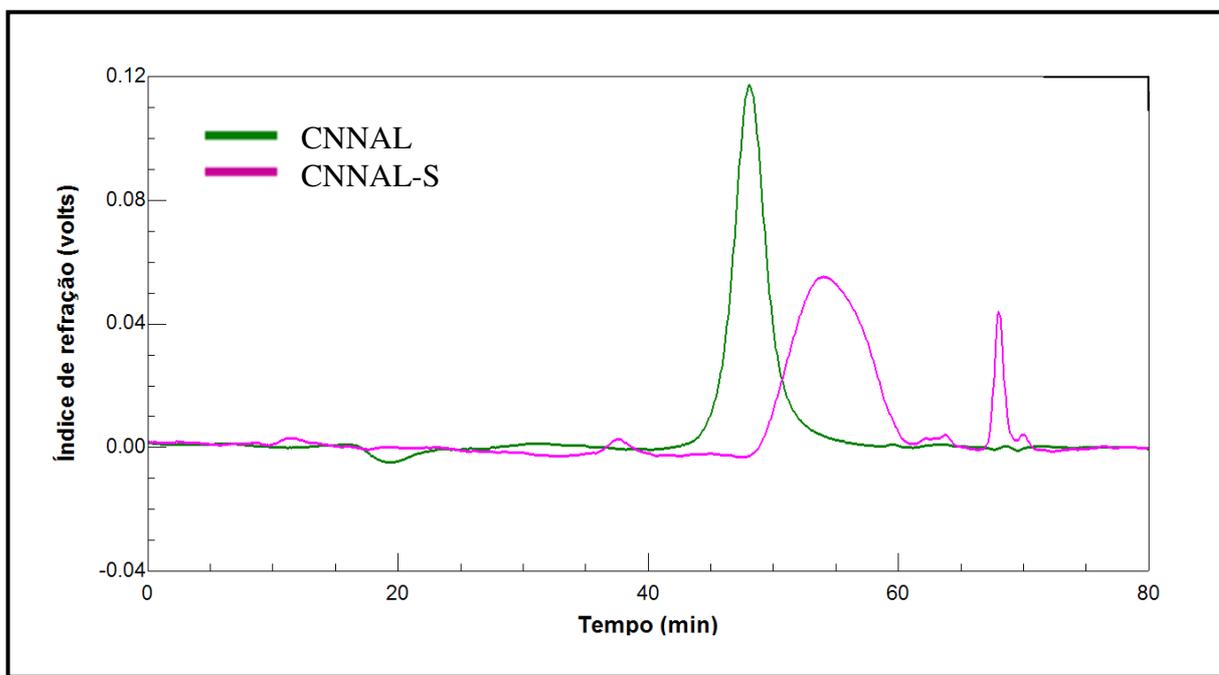


FIGURA 8 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES CNNAL E CNNAL-S OBTIDO NO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO HPSEC.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES CNNAL, CNNAL-S E CNNAL-CR2

Polissacarídeos	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%) <sup>a</sup>					
	Fuc	Ara	Xyl	4-Me-Glc	Glc	Ácido Urônico <sup>b</sup>
CNNAL	7	28	62	-	-	3
CNNAL-S	-	13	85	-	-	2
CNNAL-CR2	9	31	57	1	2	0

<sup>a</sup> Percentual relativo de monossacarídeos; <sup>b</sup> O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991.

Vale ressaltar o aumento de 5% para 16% do derivado correspondente às unidades de Xyl 2,4-di-*O*-substituídas (3-Me-Xyl) e principalmente o aumento de 3% para 56% do derivado correspondente às unidades de xilose 4-*O*-substituídas (2,3-Me<sub>2</sub>-Xyl), o que indica que a cadeia principal do polissacarídeo nativo é composta por Xylp β-(1→4) ligadas, assim como a cadeia principal dos polissacarídeos de gomas de outras palmeiras já estudadas.

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C do polissacarídeo degradado confirmou os dados de metilação (Figura 9), apresentando 5 sinais principais em δ 101,6, δ 75,5, δ 73,9, δ 72,5 e δ 63,1 que podem ser atribuídos ao C-1, C-4, C-3, C-2 e C-5 das unidades de Xylp β-(1→4) ligadas da cadeia principal. Os sinais na região δ 61,6-61,0 podem ser atribuídos ao C-5 das unidades de α-Araf ainda presentes (LÉON de PINTO *et al.*, 1994; MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003).

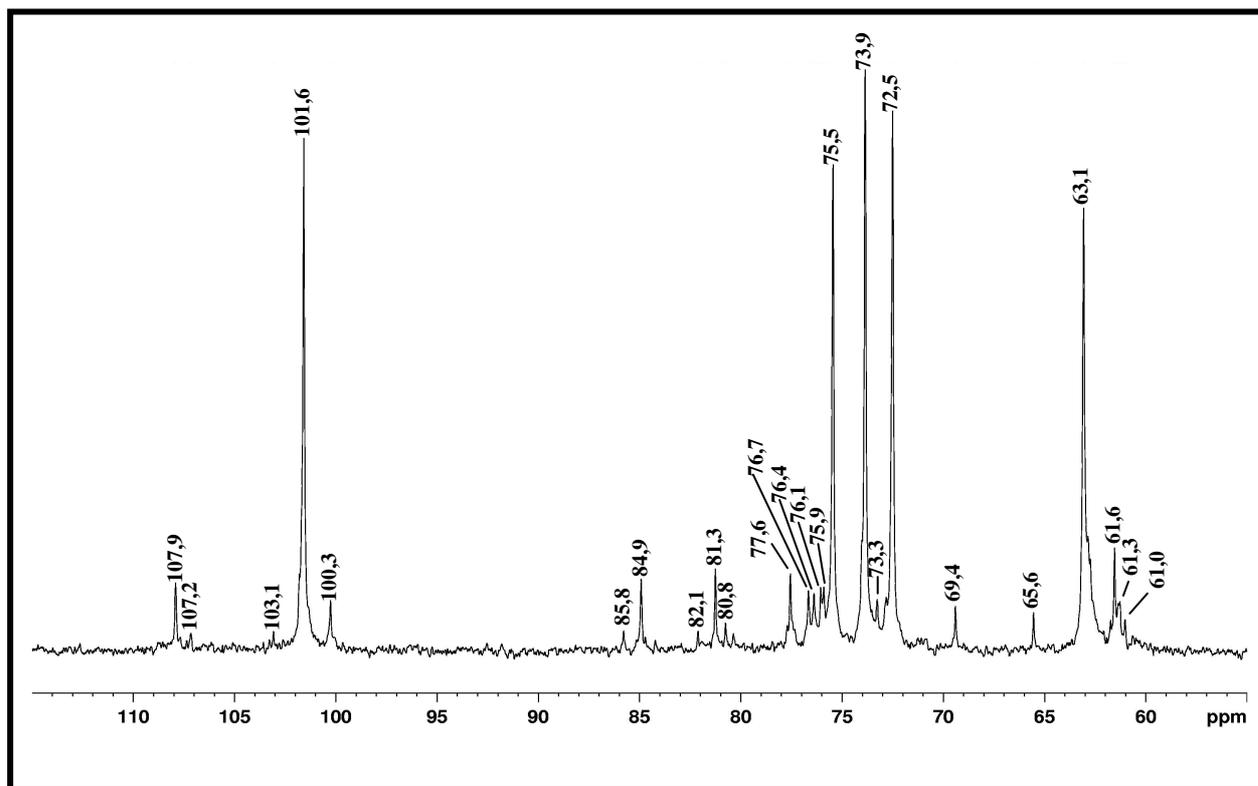


FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DO POLISSACARÍDEO CNNAL-S (EM Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>).

Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm, baseando-se no padrão interno de acetona (δ 30,2).

TABELA 4 - ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES CNNAL, CNNAL-S E CNNAL-CR2

Alditóis acetatos parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	Tipo de ligação correspondente	R <sub>t</sub> (min.) <sup>b</sup>	Polissacarídeo (%)		
			CNNAL	CNNAL-S*	CNNAL-CR2
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	Araf(1→	8.28	11	10	5
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara 2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	Arap(1→ Xylp(1→	9.01	18	tr.	5 <sup>c</sup>
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Fuc	Fucp(1→	9.08	5	-	3
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	→3)-Araf(1→	10.24	8	-	10
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl <sup>d</sup>	→4)-Xylp(1→	10.99	3	56	3
3,4-Me <sub>2</sub> -Xyl <sup>d</sup>	→2)-Xylp(1→	10.99	13	18	12
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	Glc p(1→	11.80	-	-	4
2-Me-Xyl	→3, 4)-Xylp(1→	12.75	15	-	22
3-Me-Xyl	→2, 4)-Xylp(1→	12.80	5	16	7
Xyl	→2, 3, 4)-Xylp(1→	14.78	22	-	29

<sup>a</sup> Per-O-Metilação realizada segundo Ciucanu e Kerek (1984). Após metilação, os derivados foram hidrolisados pelo método descrito por Saeman *et al.* (1954), reduzidos (NaBD4) e acetilados; <sup>b</sup> Tempo de retenção (min.) dos derivados metilados provenientes da fração CNNAL-CR2 em coluna CPSIL-5CB a 280° C; <sup>c</sup> 3% correspondem ao 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Ara (Rt 9.01) e 2% ao 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Xyl (Rt 9.04) <sup>d</sup> Valores aproximados obtidos por comparação dos íons de *m/z* 118 e 129 (isômero 2,3-) com aqueles de *m/z* 117 e 130 (isômero 3,4-) \* A fração CNNAL-S foi analisada em coluna DB-225 a 215° C.

#### 4.4 OLIGOSSACARÍDEOS LIVRES PRESENTES NA GOMA DO COQUEIRO

A partir do sobrenadante etanólico proveniente das extrações aquosas da goma (SE-CNN), foi realizada uma cromatografia analítica em papel e foi verificado a presença de oligossacarídeos livres redutores e monossacarídeos livres, que por comparação com os padrões utilizados se tratavam principalmente de arabinose e xilose. A partir desta constatação foi realizada uma análise de composição monossacarídica na fração SE-CNN que apresentou Fuc (1%), Ara (57%), Xyl (35%), Man (tr.), Gal (3%), Glc (tr.) e ácido urônico (4%).

A fração SE-CNN foi fracionada em cromatografia em papel preparativa de onde foram isoladas cinco bandas. A banda com  $R_{Lact}$  0,44 foi denominada de oligo-D (8,1 mg). Após análise por cromatografia em papel analítica foi verificada a pureza desta fração.

A fração oligo-D apresentou em sua composição, majoritariamente, Ara, Xyl e ácido urônico, conforme observado em cromatografia em papel (Figura 10). A análise de GC-MS também mostrou traços de Man, Gal e Glc. Através da análise por RMN- $^{13}C$  (Figura 11) observou-se a presença de sinais que podem ser atribuídos aos carbonos de unidades de Xyl  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ligadas, sugerindo a presença deste tipo de estrutura como constituinte do sobrenadante etanólico.

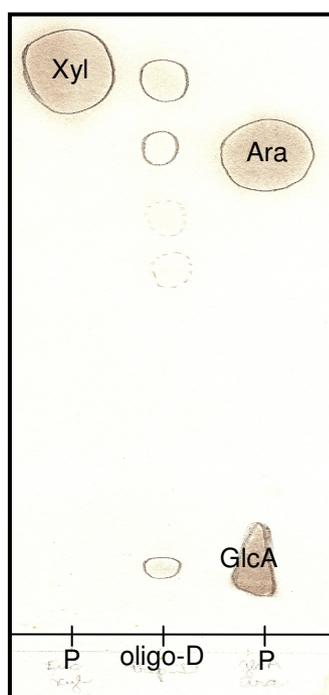


FIGURA 10 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO OLIGO-D APÓS HIDRÓLISE

Cromatografia em papel (Whatman 1MM) descendente; tempo de corrida 24 horas; solvente n-butanol:piridina:água 1:1:1 v/v; revelação nitrato de prata (TREVELYAN, PROCTER e HARRISON, 1950). P: padrões

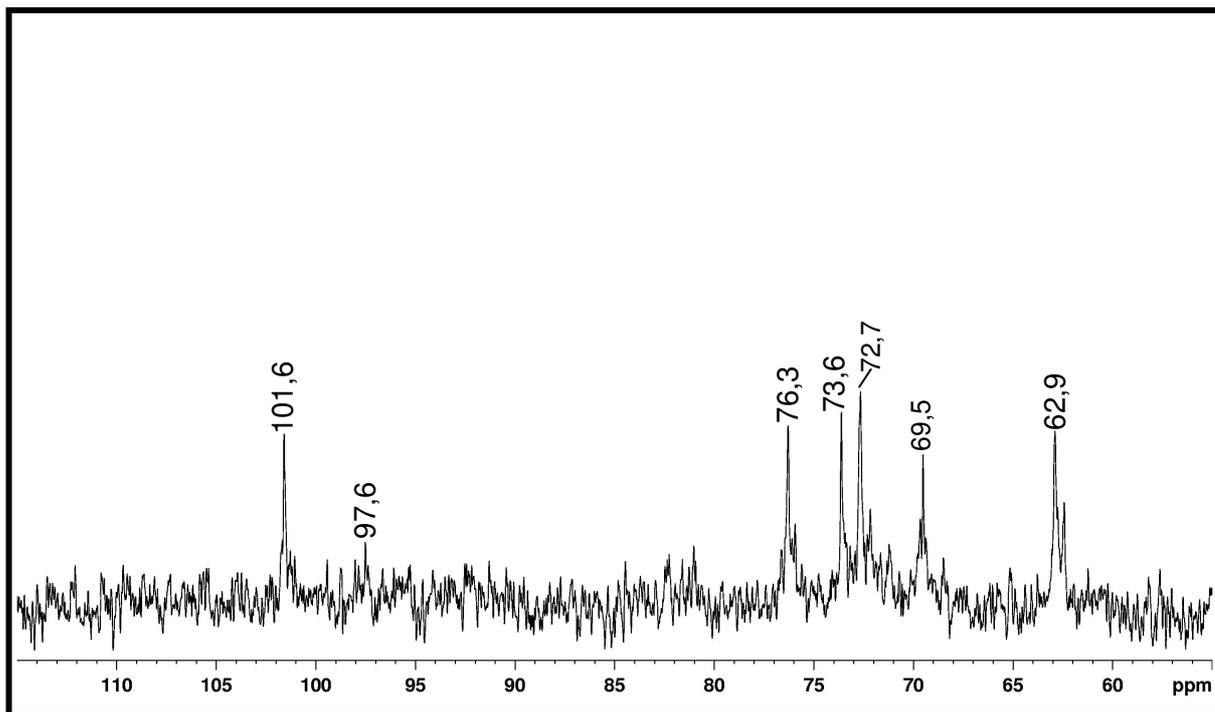


FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO OLIGO-D (EM  $\text{D}_2\text{O}$ ).

Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  ppm, baseando-se no padrão interno de acetona ( $\delta$  30,2).

## 5 CONCLUSÕES

O polissacarídeo presente na goma de exsudato vegetal de *Cocos nucifera* (CNNAL), que se apresentou homogêneo, foi caracterizado como uma heteroxilana ácida altamente ramificada composta por Ara, Xyl, Fuc e ácido urônico. Tal estrutura é similar aos polissacarídeos encontrados nas gomas de exsudatos de outras espécies de palmeiras.

A fração obtida após a degradação controlada de Smith (CNNAL-S) mostrou-se composta por Ara, Xyl e ácido urônico na proporção molar de 13:85:2. As análises de metilação e RMN-<sup>13</sup>C desta fração indicam que a cadeia principal do CNNAL é constituída por unidades de Xylp  $\beta$ -(1→4) ligadas.

O polissacarídeo CNNAL carboxi-reduzido (CNNAL-CR2) mostrou Glc e 4-Me-Glc em sua composição, indicando que o polissacarídeo nativo apresenta, como componentes ácidos, GlcpA e 4-Me-GlcpA.

A fração oligo-D, isolada do sobrenadante etanólico, apresentou em sua composição, majoritariamente, Ara, Xyl e ácido urônico, com traços de Man, Gal e Glc. Através da análise por RMN-<sup>13</sup>C observou-se a presença de sinais que podem ser atribuídos aos carbonos de unidades de Xylp  $\beta$ -(1→4) ligadas, sugerindo a presença deste tipo de estrutura como constituinte do sobrenadante etanólico.

## REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2006: Anuário da agricultura brasileira. **Coco-da-baía**. São Paulo: FNP, Consultoria e Agroinformativos, 2006. p. 286-292.

ANDERSON, D. M. W.; HIRST, S.E.; STODDART, J.F. Studies on uronic acid materials. Part. XV. The use of molecular sieve chromatography in studies on *Acacia senegal* gum (Gum arabic). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 2, p.104-114, 1966a.

ANDERSON, D. M. W.; HIRST, S.E.; STODDART, J.F. Studies on uronic acid materials. Part XXI. Some structural features of *Acacia senegal* gum (Gum arabic). **J. Chem. Soc.**, London, p.1959-1966, 1966b.

ASPINALL, G. O.; CAPEK, P.; CARPENTER, R. C.; GOWDA, C.; SZAFRANEK, J. A novel L-fuco-4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan from *Hyptis suaveolens*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 214, p. 107-113, 1991.

ASPINALL, G. O. gums and mucilages. In: WOLFROM, M. L.; TIPSON, R. S. (eds.), **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, New York, Academic Press, v. 24, p. 333-379, 1969.

BARBOSA, J. M. Cajueiro. **Galeria de inventores brasileiros**. Janeiro de 2003. Disponível em: <http://www.inova.unicamp.br/inventabrasil/cajuei.htm>. Acesso em 08/10/2007.

BeMILLER, J. N. **Industrial Gums**. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, John Wiley e Sons, v. 7, 589 p., 1987.

BOTELHO, M. L. R., Propriedades físico-químicas do exsudato de *Anacardium occidentale* L. Para indústria de alimentos. **Tese de Mestrado**, escola de Química, UFRJ. 1999.

CEREZO, A. S.; STACEY, M.; WEBBER, J. M. Some structural studies of brea gum (an exudate) from *Cercidium australe* Jonhst.). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 9, p. 505-517, 1969.

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

DEFAYE, J.; WONG, E. Structural studies of gum arabic, the exudate polysaccharide from *Acacia senegal*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 150, p. 221-231, 1986.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing monosaccharides and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, p. 1-8, 1998.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 320, p. 167-175, 1999.

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. In: GLICK, D. (ed.) **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v. 3, p. 111- 152, 1956.

EIRAS, C. *et al.* Nanocompósitos eletroativos de poli-*o*-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Quím. Nova**, vol.30, n.º.5, p.1158-1162, Out 2007.

EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS. A CULTURA DO COQUEIRO. **Sistema de produção**, 1. ISSN 1678-197X, versão eletrônica, Novembro de 2007. Disponível em:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Coco/ACulturadoCoqueiro/exigencias.htm>. Acesso em 31/07/08.

FERRI, M.G. **Botânica: Morfologia externa das Plantas (organografia)**. São Paulo: Melhoramento, 1973.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

GOLDSTEIN, I. J., HAY, G. W., LEWIS, B. A., SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L.;

GORIN, P. A. J.; HORITSU, K.; SPENCER, J. F. T. An exocellular mannan, alternately linked 1,3- $\beta$ - and 1,4- $\beta$ - from *Rhodoturula glutinis*. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 43, p. 950-954, 1965.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 53, p. 1212-1224, 1975.

GORIN, P. A. J.; TEIXEIRA, A. Z. A.; TRAVASSOS, L. R.; LABOURIAU, M. L. S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 282, p. 325-333, 1996.

HAY, G. W., LEWIS, B. A., SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. In: WHISTLER, R. L. ; WOLFROM, M. L. (eds.) **Methods in Carbohydr. Chemistry**, New York, v. 5, p. 357- 360, 1965.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Divisão Territorial do Brasil**. Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais, 1 de julho de 2008, Página visitada em 11 de outubro de 2008.

JONES, J. K. N.; SMITH, F. Plant gums and mucilages. In: WOLFROM, M. L.; TIPSON, R. S. (eds.) **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 4, p. 243- 251, 1949.

LAMBERT, R. D.; DICHEY, E. E.; THOMPSON, N. S. The uronic acids in a hydrolyzate of sapote gum. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 6, p. 43-51, 1968.

LÉON DE PINTO, G.; MARTÍNEZ, M.; RIVAS, C. Chemical and spectroscopic studies of *Cercidium praecox* gum exudate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 260, p. 17-25, 1994.

LINS, P.M.P., FARIAS NETO, J.T., MULLER, A.A. Avaliação de híbridos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) para produção de frutos e de albúmen sólido fresco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.468-470, 2003.

MARQUES, M. R.; XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate, **Phytochemistry.**, Oxford, v. 30, p. 1431- 1433, 1991.

MAURER-MENESTRINA,; SASSAKI, G. L.; SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of a highly substituted  $\beta$ -xylan from the gum exudates of the palm *Livistona chinensis* (Chinese fan). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, p. 1843-1850, 2003.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, p. 715-721, 1998.

PEDROSO, G. T.; SANTOS, H. C. A. C.; ARAGÃO W. M. Características da Inflorescência de Cultivares de Coqueiro nas Épocas Seca e Chuvosa do Ano **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, ISSN 1678-1961 Junho, 2007.

Risoleta Cardoso, 29/06/2007. Retirado de:  
[http://www.treklens.com/gallery/South\\_America/Brazil/Northeast/Alagoas/Barra\\_de\\_Sao\\_Miguel/photo302720.htm](http://www.treklens.com/gallery/South_America/Brazil/Northeast/Alagoas/Barra_de_Sao_Miguel/photo302720.htm), acessado em 01/11/2008.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, ano III, n. 1, p. 31- 36, 1993.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Technical Association of the Pulp and Paper Industry**, v. 37, p. 336-343. 1954.

SIMAS, F. F. Caracterização estrutural do polissacarídeo presente na goma do exsudato vegetal de *Scheelea phalerata* (uricuri). **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica, UFPR, 2004. 4p.

SIMAS, F. F. Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de *Prunus persica*: caracterização estrutural e análises reológicas. **Dissertação de Doutorado**, Departamento de Bioquímica, UFPR, 2007.

SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; SASSAKI, G.L.; DELGOBO, C.L.; M. Structure of a heteroxylan of gum exudate of the palm *Scheelea phalerata* (uricuri). **Phytochemistry**, v. 65 (16), p. 2347-2355, 2004.

SIMAS, F. F.; REIS, R.A.; MENESTRINA, J. M.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Structural aspects of the polysaccharide from the gum exudate of *Syagrus romanzoffiana* (Queen palm). **Carbohydrate Polymers**, v. 63 (1), p. 30-39, 2006.

SIMS, I. M.; FURNEAUX, R. H. Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*. **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 52, p. 423-431, 2003.

SMITH, F. The constitution of arabic acid. Part II. Degraded arabic acid. **J. Chem. Soc.**, London, p.1724-1738, 1939.

SMITH, F.; MONTGOMERY, R. **The chemistry of plant gums and mucilages**. New York: Reinhold Publishing Corporation, p. 1-13, 1959.

SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; Tupinambá E. A. A Introdução do Coqueiro no Brasil, Importância Histórica e Agronômica, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, ISSN 1678-1953, Novembro, 2002

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (ed.) **The Polysaccharides**, New York: Academic Press, v. 2, p. 97-180, 1983.

STODDART, J. F.; JONES, J. K. N. Some structural features of *Citrus limonia* gum (lemon gum). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 8, p. 29-42, 1968.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry.**, v. 11 (8), p. 1383-1388, 1972.

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydr. Polym.**, Oxon, v. 47, p. 151-158, 2002.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms, **Nature**, London, v. 166, p. 444, 1950.

WAGNER, R.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M.; DELGOBO, C. L.; PIMENTEL, N. M.; GORIN, P. A. J. Structure of the glycoylucuronomannan from *Vochysia lehmanii* (Quaruba). **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 57, p. 269-275, 2004.

WHISTLER, R. L. Introduction to industrial gums. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. (eds.) **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. London: Academic Press, 3<sup>a</sup> ed., 1993, p. 1-20.

WHITE, E. V. The constitution of Sapote gum. I. Methanolysis of sapote gum methyl ether. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 75, p. 257-259, 1953 (a).

WHITE, E. V. The constitution of Sapote gum. II. Components of the methyl ether derivative. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 75, p. 4692-4694, 1953 (b).

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.2, p.211-215, 1963 (b).

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.). **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.2, p.65-68, 1963 (a).

WOLFROM, M. L. (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 361- 369, 1965.