

RODRIGO VASSOLER SERRATO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CARBOIDRATOS
PRESENTES EM *Spondias cytherea* (CAJÁ)**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2002

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Aos meus pais Vilson e Meure que sempre confiaram nas minhas decisões (mesmo quando larguei a faculdade de direito) e cuja educação e exemplo são as bases da minha formação moral. Devo tudo a vocês!

Agradeço especialmente ao professor Marcello Iacomini que durante todo o tempo de orientação guiou-me e incentivou-me, e tenho certeza de que muitos outros trabalhos virão. Ganhouna minha admiração sob ponto de vista científico e sobretudo humano, considero-o como meu pai na ciência.

Se tenho um pai na ciência não posso deixar de afirmar que também ganhei um irmão científico. Meus sinceros agradecimentos ao meu “orientador de bancada” e amigo Guilherme Lanzi Sasaki pelos ensinamentos transmitidos e valorosas experiências que foram, e sempre serão, úteis em minha carreira científica. Espero poder ter o privilégio de trabalharmos juntos novamente. Obrigado mesmo!!!

Ao professor Philip Albert James Gorin pelo privilégio de conviver com a história viva da química de carboidratos. Sua experiência e bom humor são fonte de inspiração para seguir em frente na vida científica. Quem tem a oportunidade de conhecê-lo desta forma percebe que, no final das contas, vale a pena.

Ao meu quarteto preferido, minhas colegas que iniciaram comigo minha vida acadêmica e também se apaixonaram pela biologia: Ana Paula, Fernanda, Luciana e Mariana.

Uma colega de turma especial merece ser citada pela paciência e ajuda durante toda minha estada na universidade e por ter me suportado como namorado. Caro – como é que você consegue!?

Aos meus colegas, camaradas, amigos, irmãos: Renato Bochicchio e Cesar Tischer... Precisa dizer alguma coisa? Claro que precisa! Obrigado por manterem sempre o bom nível emocional, criativo e alcoólico. Eu gastaria uma página só pra agradecer por toda a ajuda que vocês me deram, mas posso dizer agora que sou eternamente grato... só não esperem que eu diga isso pessoalmente! VALEU!

Não posso deixar de agradecer meus amigos de longa data, dos tempos de colégio, que apesar de não estarem diretamente ligados a este trabalho

foram importantes na manutenção da (in)sanidade do autor: Coelho, Shinji, Nino e João... PSI rules!!!

A todos meus companheiros de laboratório que vem me ajudando, e algumas vezes atrapalhando: Elaine, Fábio, Ana Helena, Patrícia, Selene, Cíntia, Juliana, Lucimara, Caroline, Ricardo, Thales, Lauro, Anderson e Marcele. Obrigado por tudo. Não se esqueçam de que atrapalhar também faz parte, afinal, vocês também têm pesquisa pra fazer.

Aos colegas de laboratórios vizinhos: Clarice, Alan, Paula, Rose, Adriano, Alexandre, Diogo, Sérgio e Heloisa.

Ah, já estava me esquecendo do Reis... Mas ele sabe que também tem suas qualidades. É difícil, mas a gente acha uma. Rodrigão, valeu meu camarada!

Agradeço a todos os professores do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pelos ensinamentos, muitas vezes não valorizados, mas que certamente são os responsáveis pela formação da minha visão sobre a biologia. Agradecimento especial ao professor Marco Antonio Ferreira Randi por me iniciar na carreira científica como meu primeiro orientador.

Aos professores Miguel Noseda e Juliana Menestrina e às colegas Silvia Maluceli e Sandra Woranowicz pelo companheirismo e amizade.

A secretária do Curso de Ciências Biológicas, Rosane, que quebrou muitos galhos e deu muitos conselhos para minha sobrevivência no curso.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná e todos seus integrantes por oferecerem todos os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho e outros que certamente virão.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro através da bolsa de iniciação científica.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADO!

Um homem de sucesso é aquele que pula da cama de manhã e vai dormir a noite e, neste meio tempo, só faz o que gosta!

Bob Dylan

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
ABSTRACT	xi
RESUMO	xii
1. INTRODUÇÃO	02
1.1. Carboidratos	02
1.2. A Importância dos Carboidratos	02
1.2.1. Monossacarídeos	03
1.2.2. Oligossacarídeos	04
1.2.3. Polissacarídeos	05
1.3. Química de Carboidratos	08
1.4. <i>Spondias cytherea</i> (cajá)	09
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Materiais e Reagentes	14
3.2. Equipamentos	14
3.3. Material Biológico	15
3.4. Obtenção das Frações	15
3.4.1. Obtenção dos Compostos de Baixo Peso Molecular	15
3.4.1.1. Fracionamento de Carboidratos de Baixo Peso Molecular ...	16
3.4.2. Obtenção de Polissacarídeos	16
3.5. Análise das Frações	18
3.5.1. Hidrólise Ácida Total	18
3.5.2. Dosagem de Açúcares Totais	18
3.5.3. Dosagem de Ácidos Urônicos	18
3.5.4. Dosagem de Proteínas Totais	19
3.5.5. Cromatografia de Partição em Papel	19
3.5.6. Análise dos Ácidos Graxos	20

3.6. Caracterização Estrutural	20
3.6.1. Acetilação para Análise em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)	20
3.6.2. Metilação para Análise em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)	21
3.6.3. Carboxirredução de Polissacarídeos Ácidos	21
3.6.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Rendimento das Frações	23
4.2. Detecção e Quantificação Monossacarídica das Frações	25
4.3. Purificação dos Polissacarídeos	27
4.3.1. Caracterização Estrutural do Polissacarídeo	29
4.4. Carboidratos de Baixo Peso Molecular	32
4.5. Composição de Ácidos Graxos	37
5. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS

FIG. 01	Tipo de folha e frutos de <i>Spondias cytherea</i>	10
FIG. 02	Fluxograma de extração para separação de polissacarídeos e carboidratos de baixo peso molecular de <i>Spondias cytherea</i> (cajá)...	17
FIG. 03	Cromatografia em Papel das frações não hidrolisadas obtidas de <i>S. cytherea</i> revelada com AgNO ₃ (solvente: butanol:piridina:água – 1:1:1).....	25
FIG. 04	Cromatografia em papel das frações hidrolisadas obtidas de <i>S. cytherea</i> revelada com AgNO ₃ (solvente: butanol:piridina:água – 1:1:1).....	26
FIG. 05	Análise de GPC do material SASS. (—) Índice de refração; (■ ■ ■) Espalhamento de luz. Detalhe da análise de índice de refração mostrado no canto superior direito.	29
FIG. 06	Espectro de ¹³ C-RMN da fração SASS. A região de carbono anomérico está mostrada em detalhe. (padrão interno de acetona: δ 30.227).....	30
FIG. 07	Espectro de RMN de ¹³ C da fração eluída em coluna de DEAE-Sepharose com NaOH 1,0M (padrão interno de acetona: δ 30.197)...	32
FIG. 08	Espectro de RMN de ¹³ C do sobrenadante etanólico (SBN EtOH). Comparação do espectro obtido de SBN EtOH (vermelho) e do espectro de ¹³ C-RMN da sacarose (azul).....	33
FIG. 09	Cromatogramas obtidos em GC-MS por tratamentos diferenciados de quatro alíquotas da fração SBN EtOH. 1) acetilado; 2) reduzido e acetilado; 3) hidrolisado e acetilado; 4) hidrolisado, reduzido e acetilado. (coluna DB-225 a 50°C até 250°C - 40°C min ⁻¹). Valores mostrados em porcentagem relativa.....	35
FIG. 10	Espectro de RMN de ¹³ C do extrato CHCl ₃ :MeOH (2:1 v/v).....	38

LISTA DE TABELAS

TAB. 01	Peso e rendimento das frações obtidas através de extrações sucessivas da polpa do fruto de <i>Spondias cytherea</i>	24
TAB. 02	Composição monossacarídica das frações obtidas de <i>Spondias cytherea</i> segundo análise em GC-MS.....	27
TAB. 03	Peso e rendimento das frações G/DG.....	28
TAB. 04	Porcentagem de amido em cada subfração G/DG.....	28
TAB. 05	Análise dos O-Metil-alditol acetatos obtidos da fração SASS.....	31
TAB. 06	Composição monossacarídica presente nas frações obtidas da coluna de carvão:celite do material SBN EtOH de <i>Spondias cytherea</i>	34
TAB. 07	Composição monossacarídica das alíquotas da fração SBN EtOH tratadas diferentemente.....	36
TAB. 08	Composição de ácidos graxos das frações lipídicas de <i>Spondias cytherea</i>	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

δ - Deslocamento Químico (ppm)

λ - Comprimento de Onda (ηm)

~ - Aproximadamente

AgNO₃:Acetona - Nitrato de Prata:Acetona

Ara - Arabinose

CCD (TLC) – Cromatografia de Camada Delgada

CHCl₃:MeOH - Clorofórmio:Álcool Metílico

CP - Cromatografia em Papel

D₂O - Água Deuterada

DMSO - Dimetil Sulfóxido

EtOH - Álcool Etilico

f - Furanosídico

Fuc - Fucose

Fru - Frutose

g - Gramas

G/DG - Gelo e Degelo (congelamento e degelo)

Gal - Galactose

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

GLC - Cromatografia Líquida-Gasosa

Glc - Glucose

GPC - Cromatografia de Gel Permeação

HCl - Ác. Clorídrico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

KOH - Hidróxido de Potássio

M - Molar

m/Z - Relação Massa/Carga

Man - Manose

Me - Metil

MHz - Mega Hertz

MeI - Iodeto de Metila
MeOH – Álcool Metílico
mg - Miligramas
min - Minutos
ml - Mililitros
mm - Milímetros
NaBH₄ - Borohidreto de Sódio
NaCl - Cloreto de Sódio
NaOH - Hidróxido de Sódio
p - Piranosídico
p/p - Peso por Peso
p/v - Peso por Volume
PAPK2 - Precipitado G/DG do Extrato Alcalino 2%
PAPP - Precipitado G/DG do Precipitado HCl
PAPS - Precipitado G/DG do Sobrenadante HCl
PhOH:H₂SO₄ - Fenol:Ác. Sulfúrico
ppm - Partes por Milhão
ppt - Precipitado
Ram - Ramnose
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
Rt - Tempo de Retenção
rpm - Rotações por Minuto
SASK2 - Sobrenadante G/DG do Extrato Alcalino 2%
SASP - Sobrenadante G/DG do Precipitado HCl
SASS - Sobrenadante G/DG do Sobrenadante HCl
sbn - Sobrenadante
TFA - Ácido Trifluoracético
v/v - Volume por Volume
Xil - Xilose

ABSTRACT

The main objective on this work was the study of the carbohydrate content found on the fruit pulp of *Spondias cytherea*. Organic extractions were carried out yielding 77% of low molecular weight compounds (20% lipids). The total sugar content from the integral pulp yield was 41% as by the PhOH-H₂SO₄ method, the integral pulp has also presented 3% of uronic acids content. Total acid hydrolysis of low molecular weight compounds gave rise to Glc, Man, Ara and Ins in a 88:4:3:2 molar ratio respectively, the presence of these sugars was also confirmed by paper chromatography using AgNO₃ a developer: sucrose was not detected. A ¹³C NMR spectrum was also performed confirming the absence of sucrose. CHCl₃:MeOH (2:1, v/v), (CH₃)₂CO and EtOH extracts were methanolized with 3% HCl under reflux in order to analyze the fatty acid composition and thus showed the presence mainly of C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:4} and C_{22:0} fatty acids methyl esters analysed by GC-MS. The polysaccharides were obtained via hot aqueous and alkaline extractions. The former was precipitated with HCl (pH 2) resulting in two new fractions (sbn. HCl and ppt. HCl). These along with the 2% KOH fraction, were submitted to freeze/thawing (F/T) and amylase treatment in order to eliminate the starch. The F/T precipitated (PAPS) and supernatant (SASS) of the sbn HCl fraction showed 17% and 10% of starch respectively. The ppt HCl fraction did not contain starch in either of its F/T sub-fractions. The 2% KOH fraction resulted in 71% of starch in the F/T supernatant and 8.5% in its precipitate. The total starch found in the integral fruit pulp was estimated as about 5% of its dry weight. The SASS fraction was selected to be characterized and the monosaccharide composition presented Ara, Gal, Glc and Rha in a 41:33:15:10 molar ratio respectively. The homogeneity analysis suggested a pectin aggregated with another polysaccharide. The ¹³C-NMR spectrum showed three main signals in the anomeric region at δ 107.5, 103.5 and 100.1 which were attributed to α-L-Araf, α-D-Galp and α-D-GlcpA respectively, the latter being confirmed by the presence of signals at δ 174.5 and δ 170.5, corresponding to C-6 of the uronic acid residue esterified and not esterified by methyl groups. These results reinforce the previous suggestion of a mixture of two polysaccharides, namely an arabinogalactan and a pectin.

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo dos carboidratos encontrados na polpa do fruto de *Spondias cytherea*. Extrações orgânicas foram feitas apresentando um rendimento de 77% de material de baixa massa molecular (20% lipídeos) do material total extraído. O conteúdo de açúcar total da polpa integral foi de 41% segundo o método do PhOH-H₂SO₄, a polpa integral também apresentou 3% de ácidos urônicos. Hidrólise ácida total dos compostos de baixa massa molecular revelou a presença de Glc, Man, Ara e Ins numa proporção molar de 88:4:3:2 respectivamente, a presença destes açúcares foi também confirmada por cromatografia em papel utilizando AgNO₃ como revelador: sacarose não foi detectada. Um espectro de RMN de ¹³C foi realizado confirmando a ausência de sacarose. Os extratos CHCl₃:MeOH (2:1, v/v), (CH₃)₂CO e EtOH foram metanolizados com HCl 3% sob refluxo na intenção de analisar a composição dos ácidos graxos presentes sendo eles principalmente os metil-ésteres de *o*f C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:4} e C_{22:0} analisados por GC-MS. Os polissacarídeos foram obtidos através de extração aquosa e alcalina a quente. O extrato da primeira foi então precipitada com HCl (pH 2,0) resultando em duas novas frações (sbn HCl e ppt HCl). Ambas, juntamente com a fração KOH 2%, foram submetidas a gelo/degelo (G/DG) e tratamento com amilase para a eliminação do amido. O precipitado G/DG (PAPS) e o sobrenadante (SASS) da fração sbn HCl apresentaram 17% e 10% de amido respectivamente. A fração ppt HCl não apresentou quantidade significativas de amido em nenhuma de suas subfrações G/DG. A fração KOH 2% resultou em um conteúdo de 71% de amido em seu sobrenadante G/DG e 8,5% em seu precipitado. A quantidade total de amido presente na polpa integral do fruto foi de aproximadamente 5% do seu peso seco. A fração SASS foi selecionada para ser caracterizada e apresentou uma composição monossacarídica de Ara, Gal, Glc e Rha numa razão molar de 41:33:15:10 respectivamente. A análise de homogeneidade sugeriu uma pectina agregada a um outro polissacarídeo. A análise de RMN de ¹³C mostrou três sinais principais na região anomérica em δ 107.5, 103.5 e 100.1 que foram atribuídos a α -L-Araf, α -D-Galp and α -D-AGlup, o último sendo confirmado pela presença de sinais em δ 174.5 e δ 170.5 correspondendo aos sinais de C-6 esterificados e não esterificados por grupos metil. Estes resultados reforçam a sugestão prévia de uma mistura de dois polissacarídeos, nominalmente uma arabinogalactana e uma pectina.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carboidratos

Os glicídios são uma das grandes classes de macromoléculas biológicas naturais juntamente com proteínas e lipídios. Carboidratos possuem uma fórmula geral representada por CH_2O e, portanto, foram antes denominadas como "hidratos de carbono". Contudo, o arranjo dos átomos em carboidratos tem pouca relação com moléculas de água. Carboidratos contêm grandes quantidades de grupos hidroxila e são basicamente divididos em dois grupos segundo outros grupamentos químicos presentes: aldeídos ou cetonas. São divididos também de acordo com o tamanho de suas moléculas: monossacarídeos (glucose), oligossacarídeos (lactose, sacarose) e polissacarídeos (celulose, amido). As unidades monossacarídicas ligam-se geralmente por de ligações O-glicosídicas em qualquer um dos carbonos da molécula. A estereoquímica das moléculas de carboidratos é dependente da posição da hidroxila do carbono anomérico (C-1) em relação ao restante da molécula, desta forma os monossacarídeos são encontrados nas formas α ou β e sofrem o processo de mutarotação. Alguns tipos de carboidratos ainda podem apresentar em sua estrutura átomos de nitrogênio, fósforo e enxofre (NELSON e COX, 2000).

1.2. A Importância dos Carboidratos

Os carboidratos desempenham várias funções nos sistemas vivos. Podem ser parte de um sistema estrutural (celulose, hemicelulose, pectinas),

de reserva (glicogênio, amido), energético (glucose) ou apresentar atividade biológica em outros processos (heparina). Associações de carboidratos com outras moléculas orgânicas ocorrem naturalmente na forma de glicolipídeos e glicoproteínas e são parte importante do metabolismo de várias formas animais e vegetais.

1.2.1. Monossacarídeos

Os açúcares que são encontrados em materiais naturais são particularmente importantes por causa de suas funções biológicas e suas atuais ou potenciais aplicações na indústria. A cadeia de monossacarídeos naturais geralmente varia de 3 a 9 átomos de carbono, contudo os monossacarídeos mais freqüentemente encontrados são certamente as pentoses (5 átomos de C) e as hexoses (6 átomos de C).

Açúcares naturais comumente ocorrem em combinações glicosídicas (de duas ou mais moléculas do mesmo ou diferentes açúcares) que podem estender-se a polímeros. Numerosas substâncias ocorrem naturalmente nas quais os monossacarídeos ligados são constituintes importantes. Um bom exemplo é a presença do monossacarídeo fosforilado D-ribose e 2-deoxi-D-eritro-pentose (2-desoxi-D-ribose) achados em nucleotídeos poliméricos (ácidos nucleicos). Monossacarídeos livres também desempenham um papel importante no metabolismo biológico. Alguns açúcares ocorrem livres em plantas tais como D-glucose, L-arabinose e D-frutose. No que diz respeito a ocorrência de açúcares livres em animais, D-glucose é um componente normal do sangue, linfa e outros fluidos corporais. Foi achado L-frutose no sangue de

neonatos; esta cetose também é achada no sêmen. Traços de várias pentoses e hexoses são achados normalmente na urina humana, o nível de dois açúcares, L-xilulose e D-glucose, são aumentados em casos de pentosuria e diabetes respectivamente (SCHAFFER, 1972).

As fontes preferidas de monossacarídeos são certamente os polissacarídeos, constituídos de repetidas unidades destas moléculas. Os diferentes monômeros de um polímero podem ser separados facilmente através de hidrólise ácida e oferecem um bom rendimento. Outras fontes mais complexas podem fornecer apenas uma limitada quantidade de material monossacarídico e usualmente não são eficientes para os propósitos desejados.

1.2.2. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos compreendem uma grande e importante classe de carboidratos que são achados tanto livres quanto combinados em virtualmente qualquer organismo vivo. Em estrutura os oligossacarídeos são compostos de relativamente poucas unidades de monossacarídeos ligados através de ligações glicosídicas que são facilmente hidrolisadas em solução ácida para fornecer sua composição monossacarídica. É postulado que um carboidrato composto de 2 a 10 resíduos de monossacarídeos quimicamente ordenados definem a estrutura de um oligossacarídeo. Oligossacarídeos que ocorrem livres na natureza geralmente possuem algumas propriedades estruturais únicas ou propriedades pouco comuns que têm um valor especial para os organismos biológicos (KANDLER, 1980). Os exemplos mais comuns deste

grupo são a sacarose e a lactose, o primeiro sendo distribuído universalmente em plantas e o segundo sendo o principal carboidrato constituinte das secreções das glândulas mamárias.

Muita ênfase tem sido dada nas últimas décadas sobre natureza e função de muitas enzimas, incluindo glicosidases, e muitos oligossacarídeos têm sido sintetizados utilizando estas enzimas. Uma variedade de métodos químicos está disponível para a síntese de oligossacarídeos, sendo estas pela união de monossacarídeos ou pela quebra de polissacarídeos para formar subunidades oligossacarídicas. Há também várias técnicas de análise estrutural das moléculas de oligossacarídeos e centenas de estruturas já foram classificadas, entretanto, ainda existem muitas moléculas a serem esclarecidas estruturalmente, assim como funcionalmente. A função biológica de vários oligossacarídeos é bem conhecida mas há muitas áreas para a pesquisa química, enzimologia e função de oligossacarídeos a serem descobertas. (PAZUR, 1970)

1.2.3. Polissacarídeos

Polissacarídeos são componentes de quase todos os organismos vivos. São muito abundantes nas ordens superiores de plantas e em algas marinhas onde constituem aproximadamente três quartos do peso seco. São abundantes também em fungos e no exoesqueleto de insetos e crustáceos. Aparecem como importante componente das cápsulas de microorganismos e na cartilagem de animais, pele e mucosas. Os polissacarídeos desempenham papéis diversos na fisiologia de plantas, animais e microorganismos. Servem

também como estrutura material em plantas e em muitos organismos fornece combustível de reserva para manter a uniformidade da queima energética do metabolismo. Como material de superfície servem para proteger tecidos da dessecação e como gomas são exudadas das plantas servindo para selar e proteger ferimentos. Alguns polissacarídeos ácidos agem como moléculas de adesão celular no tecido cortical de frutos (KNEE, 1978). São importantes no reconhecimento do grupo sangüíneo e especificidade de outras reações imunológicas nos animais. Enfim, muitos outros papéis dos muitos polissacarídeos estão por ser desvendados.

Em abundância, a celulose transcende todos os outros polissacarídeos; em peso ela sozinha igualar-se-ia a todos os outros polissacarídeos combinados. Talvez as próximas em abundância seriam as xilanas, componentes que fazem parte da estrutura vegetal. Em quantidades mais modestas ocorrem os álgares, encontrados nas algas marinhas. A quitina dos insetos e conchas de crustáceos e as pectinas e amido ocorrem também em quantidades significativas. Polissacarídeos contendo apenas um tipo de unidade monossacarídica (homopolissacarídeos) são mais abundantes do que outros formados por dois ou mais tipos de unidades monoméricas (heteropolissacarídeos), contudo, os últimos são mais numerosos. Polímeros de D-glucose (glucanas) são os mais abundantes considerando que a celulose, amido (amilose e amilopectina) e laminaranas são membros desta classe.

As pectinas constituem uma classe particular de polissacarídeos por apresentarem cadeias principais ácidas. Três pectinas são fundamentalmente encontradas na parede celular primária de plantas superiores:

homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II. Pectinas apresentam estruturas complexas altamente ramificadas e que parecem ser conservadas dentro das diferentes famílias vegetais (WILLATS *et al*, 2001). Outra classe importante de polissacarídeos são as arabinogalactanas. Estas moléculas encontram-se freqüentemente ligadas covalentemente a proteínas e possuem um papel fundamental na fisiologia vegetal. Estão presentes em praticamente todas as famílias de vegetais superiores e participam de variadas funções tais como divisão celular, apoptose, embriogênese somática, crescimento do tubo polínico, microesporogênese, formação do xilema e regulação no crescimento. Diferentes arabinogalactanas-proteína (AGP) podem estar presentes em vários tecidos e diferente localização celular, algumas ainda parecem desaparecer durante o desenvolvimento. Apesar da confirmação da presença de AGPs nos diversos processos fisiológicos descritos, ainda não há uma relação entre a função de uma única arabinogalactana e sua estrutura (NOTHNAGEL *et al*, 2001).

Polissacarídeos são formados geralmente em condições impuras sendo depositados juntamente com proteínas, lipídeos e muitas outras substâncias biológicas. Alguns exudatos de plantas (gomas) são praticamente polissacarídeos puros apresentando apenas traços de outros materiais. O mesmo ocorre com o amido acumulado em certas sementes e raízes de tuberosas. Animais produzem certamente menos polissacarídeos do que as plantas, ainda assim, esta pequena variedade tem uma importância crucial na fisiologia de um organismo. Glicogênio é formado a partir de unidades de D-glucose e usado como reserva energética encontrado em virtualmente todo o

reino animal. A heparina é um polissacarídeo importante na anticoagulação sangüínea nos animais (WHISTLER, 1953).

O ácido hialurônico é importante na fixação celular, particularmente tecidos mesenquimais, e sua destruição pode deixar o tecido exposto à invasão e difusão de microorganismos. Animais de grande porte não necessitam de polissacarídeos para auxiliar na sua estrutura corporal, alguns animais menores contudo usam quitina como material principal de sustentação. Outras moléculas estruturais importantes na resistência e sustentação mecânica em animais são as proteoglicanas, agregados de proteínas e polissacarídeos presentes na matriz celular.

1.3. Química de Carboidratos

Os processos cromatográficos, espectrofotométricos e espectrométricos são comumente utilizados na elucidação estrutural e composição química de macromoléculas (oligo e polissacarídeos) baseados em seu constituinte unitário (monossacarídeos).

Mono, oligo e polissacarídeos exibem uma grande variedade estrutural com vastas diferenças químicas e propriedades físicas. Os polissacarídeos em especial podem ser formados por várias unidades diferentes de monossacarídeos (heteropolissacarídeos) ou constituídos pela mesma unidade monossacarídica (homopolissacarídeos) com diversas possibilidades de ramificações e ligações glicosídicas. Em contraste com os vários métodos disponíveis para análise de outra grande classe de moléculas biológicas, os aminoácidos, não há uma metodologia simples que seja adequada para a

análise qualitativa e quantitativa de todos os glicídios (NELSON e COX, 2000). A escolha do método dependerá do número de fatores incluindo a eficácia necessária e a disponibilidade dos recursos. As técnicas mais comumente utilizadas para uma análise qualitativa e quantitativa de misturas de monossacarídeos são a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), bem como o uso de técnicas cromatográficas mais simples como cromatografia em papel (CP) e cromatografia de camada delgada (CCD ou TLC) e métodos colorimétricos, como o fenol-sulfúrico (PhOH:H₂SO₄). A utilização da espectroscopia de infravermelho (IR) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C aliada à espectrometria de massa vem sendo amplamente utilizada na determinação estrutural de glicídios, desde monossacarídeos (BOCK *et al.*, 1984) até polissacarídeos (GORIN, 1981) bem como oligossacarídeos e glicoconjugados.

1.4. *Spondias cytherea* (cajá)

O gênero *Spondias* é representante da família Anacardiaceae e apresenta várias espécies (*S. mombin*, *S. purpurea*, *S. tuberosa*, *S. mangifera*, etc) distribuídas em toda a região tropical mas principalmente nos países da América do Sul. A espécie mais conhecida é *Spondias cytherea* (cajá), nativa de ilhas do Pacífico mas cultivada pantropicalmente. *S. cytherea* é uma árvore de médio porte e de crescimento rápido que pode alcançar até 15 metros de altura. Possui uma copa exuberante com folhas compostas pinadas que crescem até 30 centímetros de comprimento. As folhas caem por breves

períodos durante os meses de inverno. Pequenas flores brancas nascem em aglomerados durante o verão e os frutos ovais com 4 a 6 centímetros amadurecem no outono. Os frutos maduros apresentam uma casca amarelodourada e uma polpa laranja-amarelada circundando uma única semente (Figura 01).

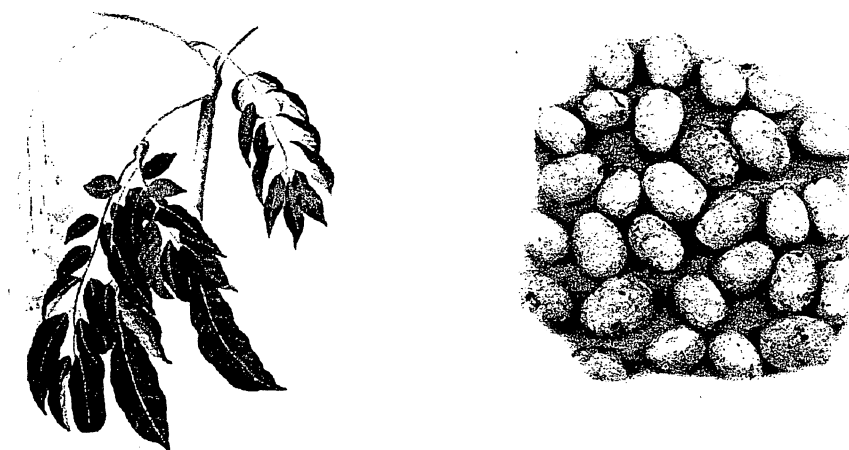


Figura 01 – Tipo de folha e frutos de *Spondias cytherea*.

No Brasil, encontra-se esta planta nas regiões Norte e Nordeste, da floresta amazônica até o extremo norte da Bahia. Grandes propriedades dedicam-se a cultura de cajá principalmente nos estados do Piauí, Maranhão e Bahia, havendo também áreas de cultivo isoladas no Paraná e Santa Catarina. A planta é sensível ao frio quando jovem e deve estar protegida de geadas ou climas frios. Mesmo plantas adultas podem perecer em temperaturas inferiores a 10°C. Seu melhor crescimento é encontrado quando exposta diretamente ao sol, podendo crescer até 2 metros num único ano. Seus frutos porém são melhor produzidos quando a planta cresce sob uma leve sombra, estas não devem porém ser plantadas sob outras árvores de copa larga que produzem muita sombra. É conhecida popularmente como Cajá mas encontram-se outras nomenclaturas tais como Cajá-manga, Cajá-mirim, Cajarana, Umbu, Taperabá

e Ciriguela, dependendo do local onde são encontradas. Os frutos quando maduros, possuem um sabor ácido-adocicado e são de grande importância para a alimentação dos animais nas regiões onde crescem nativos e apreciados comercialmente pelo homem. Podem ser consumidos crus ou cozidos mesmo antes de amadurecerem, também são usados na fabricação de doces, geléias, sorvetes e sucos. Através de sua fermentação faz-se uma bebida alcoólica. Da resina pegajenta do cajazeiro faz-se cola para indústrias. Existem alguns relatos sobre a composição química dos frutos, principalmente com enfoque nutricional. A literatura em medicina nutricional traz especulações sobre a porcentagem de proteínas, glicídios, lipídios e vitaminas presentes nos frutos de cajá, porém muitas destas informações são conflitantes e não podem ser tomadas como verdadeiras sem um estudo científico que as comprovem.

Algumas propriedades das anacardiáceas são relatadas na farmacologia popular. O fruto de *Anacardium occidentale* (cajú), membro da família anacardiaceae ao qual o gênero *Spondias* pertence, é dito conter propriedades antivirais e antiinflamatórias (ABAD *et al.*, 1996), combate a diarreia e funciona como creme para cicatrização. Trabalhos científicos demonstram a atividade antitumoral *in vitro* de frações extraídas do fruto de *A. occidentale* (KUBO *et al.*, 1993). Na farmacologia tradicional Peruana, a casca do tronco de *S. cytherea* é utilizada para a preparação de soluções anti-sépticas (VILLEGAS *et al.*, 1997). Na Colômbia, as raízes são utilizadas na medicina popular para tratamento de diarreia, febre e enxaqueca. Infusões das folhas (chá) são utilizadas no tratamento de resfriados, febres, gonorréia, cistites, uretrites e na limpeza e cicatrização de ferimentos. Outras espécies de *Spondias* já foram estudadas e

suas atividades farmacológicas comprovadas, como no caso de *S. mombin* cujo extrato alcoólico das folhas apresentou alta atividade antibiótica comparável a de drogas clássicas como ampicilina e gentamicina (AEO *et al.*, 1999). Não há contudo registro do uso dos frutos de *S. cytherea* ou de qualquer outra espécie do gênero como agente farmacológico ou de tratamento de doenças.

A presença de polissacarídeos em exudatos vegetais (gomas) é bem conhecida. Alguns trabalhos relatam a estrutura de oligo e polissacarídeos em exudatos de plantas da família anacardiaceae como *Anacardium occidentale* (MENESTRINA *et al.*, 1998), *Spondias mombin* (PINTO *et al.*, 2000) e *Spondias pinnata* (PRADYOT, 1981). A atividade farmacológica presente em exudatos de anacardiáceas é relatada por MARQUES (1991). Polissacarídeos de parede celular de *Spondias cytherea* também foram estudados por MASSIOT *et al.* (1991), assim como alguns óleos extraídos de diferentes espécies de *Spondias* (LEMOS *et al.*, 1995). Em contrapartida, nenhuma bibliografia científica abrangendo a composição de carboidratos dos frutos das diferentes espécies de *Spondias* foi encontrada.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

Objetivo Geral

- Estudo de carboidratos da polpa do fruto de *Spondias cytherea* (cajá).

Objetivos Específicos

- Extrair e purificar polissacarídeos e carboidratos de baixo peso molecular da polpa do fruto de *Spondias cytherea* (cajá) utilizando solventes orgânicos e aquosos em extrações seqüenciais.
- Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos e carboidratos de baixo peso molecular extraídos utilizando técnicas espectroscópicas (RMN), espectrométricas (GC-MS) e métodos químicos.
- Extrair os ácidos graxos da polpa da fruta de *Spondias cytherea* (cajá) utilizando solventes orgânicos.
- Determinar a composição de ácidos graxos por GC-MS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e Reagentes

Padrões de monossacarídeos (ác. glucurônico, ác. galacturônico, glucose, arabinose, galactose, manose, xilose, ribose, ramnose, fucose, outros), dissacarídeos (lactose, sacarose e trealose) e poliálcoois (inositol e manitol) foram obtidos da Sigma Chemical Co.

Papel filtro para cromatografia no. 1 (qualitativo) e no. 3 (preparativo) foram obtidos da Whatman.

Solventes para cromatografia em papel (*n*-butanol, piridina, etanol, isopropanol, ác. acético, acetato de etila) e reagentes reveladores (nitrato de prata, cloridrato de *p*-anisidina, orcinol e ác. sulfúrico) foram obtidos da Merck.

Qualquer outro produto ou reagente utilizado durante a realização deste trabalho possuía grau analítico de pureza.

3.2. Equipamentos

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – RMN Bruker DRX 400

Cromatógrafo Gasoso Espectrômetro de Massa – GC-MS Varian ITD 3300

Cromatógrafo Líquido de Alta Performance – HPLC Shimadzu

Cromatógrafo de Gel-Permeação – GPC Walters Wyatt

Cromatógrafo Líquido-Gasoso – GLC HP 5890 II

Espectrofotômetro Hitachi U-2001

Liofilizador Edwards

Equipamentos comuns de laboratório (balança, estufa, capela, etc.)

3.3. Material Biológico

A polpa integral da fruta de *Spondias cytherea* (cajá) foi fornecida pela BRASFRUF-FRUTOS DO BRASIL LTDA situada à Rod. BR 324, Km 98, Feira de Santana, BA. A indústria não faz nenhum tipo de tratamento químico prévio com o fruto para a comercialização.

3.4. Obtenção das Frações

Uma porção da polpa do fruto de *Spondias cytherea* foi liofilizada para a obtenção do peso seco do material (36 g). Com o peso do material seco foram realizadas sucessivas extrações orgânicas e aquosas diferenciadas para a obtenção dos rendimentos de cada fração e análise dos compostos de cada extração.

3.4.1. Obtenção de Compostos de Baixo Peso Molecular

A obtenção de oligossacarídeos e outros compostos de baixo peso molecular foi feita através de extrações sucessivas do material previamente seco e pesado. Primeiramente, o material foi extraído em CHCl_3 :MeOH (2:1 v/v) a 70° durante 2 horas em sistema de refluxo (3x). O resíduo desta extração foi submetido a extração com acetona, sob as mesmas condições (3x). As próximas extrações foram feitas em EtOH e posteriormente em água durante 2 horas a 100° C em sistema de refluxo (3x). O extrato aquoso sofreu então precipitação etanólica (3:1 v/v) e foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min. O fluxograma de extração é mostrado na figura 02. Todos os extratos obtidos e a

fração do sobrenadante etanólico da extração aquosa (SBN EtOH) foram liofilizados e pesados para que se obtivesse o peso seco e o rendimento total de cada extração.

3.4.1.1. Fracionamento de Carboidratos de Baixo Peso Molecular

Para a separação e purificação dos oligossacarídeos encontrados nas frações com moléculas de baixo peso molecular, foi utilizada uma coluna de adsorção de carvão ativo-celite (1:1 p/p) (PAZUR, 1981) e eluições sucessivas com água destilada (obtenção de monossacarídeos) e concentrações crescentes de EtOH (5, 10, 15, 20 e 50%) para a obtenção de oligossacarídeos de diferentes massas moleculares). Cada fração EtOH foi recolhida em tubos até que o teste de PhOH:H₂SO₄ fosse negativo e outra eluição com uma próxima concentração de EtOH fosse realizada.

3.4.2. Obtenção de Polissacarídeos

O resíduo proveniente da extração aquosa foi extraído com KOH 2% a 100°C durante 2 horas em sistema de refluxo. Posteriormente, o resíduo desta extração foi extraído com KOH 10% sob as mesmas condições. Tratamentos de gelo e degelo (G/DG) e precipitações ácidas com HCl (pH 2,0) também foram utilizados na separação de polissacarídeos das frações. Os extratos alcalinos 2% e 10%, juntamente com o material precipitado da precipitação etanólica do extrato aquoso (ppt EtOH) e demais processos de separação foram liofilizados para que se obtivesse o rendimento em peso destas extrações. O fluxograma das extrações é mostrado na Figura 02.

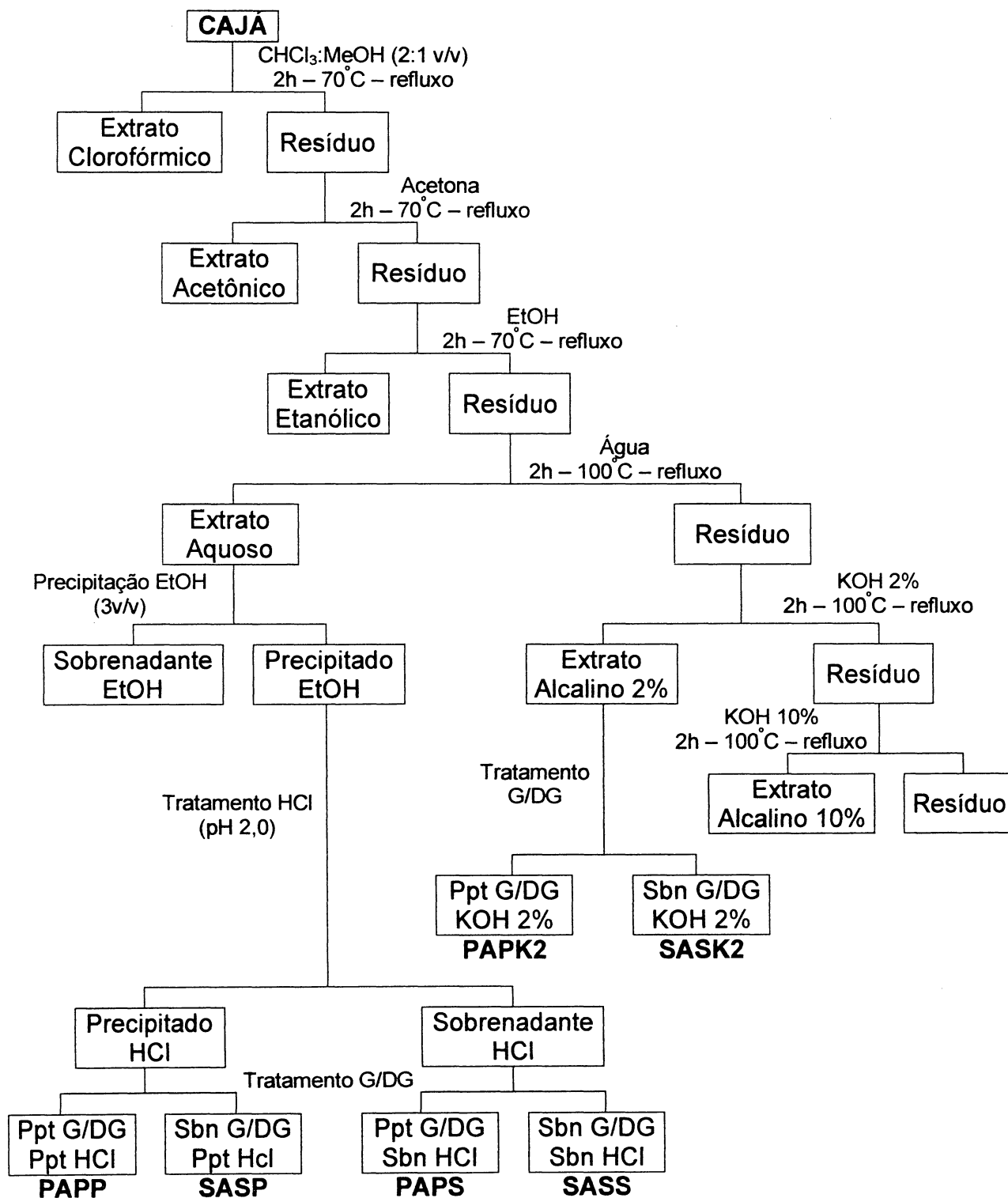


Figura 02 – Fluxograma de extração para separação de polissacarídeos e carboidratos de baixo peso molecular de *Spondias cytharea* (cajá).

3.5. Análise das Frações

3.5.1. Hidrólise Ácida Total

O material contendo carboidratos, obtido das extrações foi hidrolisado em ácido trifluoracético (TFA) 2M durante 8 horas a 100°C para a obtenção dos monossacarídeos que constituem os oligo e polissacarídeos das frações (WHITON *et al*, 1985).

3.5.2. Dosagem de Açúcares Totais

Os açúcares totais das frações foram dosados pelo método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (PhOH:H₂SO₄), como descrito por DUBOIS *et al.*, (1956), utilizando-se como açúcar padrão D-glucose. A análise colorimétrica foi feita em espectrofotômetro Hitachi U-2001 (λ 490 nm).

3.5.3. Dosagem de Ácidos Urônicos

Para a quantificação dos ácidos urônicos presentes nas frações foi utilizado o método colorimétrico do *m*-hidroxibifenil, descrito por BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973). A análise colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro Hitachi U-2001 (λ 520 nm).

3.5.4. Dosagem de Proteínas Totais

As dosagens de proteínas em cada fração foram feitas pela metodologia descrita por BRADFORD (1976) utilizando o reagente Coomassie Blue Brillhante G-250 e albumina de soro bovina (BSA) como proteína padrão (300 μ g/ml). A análise colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro Hitachi U-2001 (λ 595 nm).

3.5.5. Cromatografia de Partição em Papel

Para a observação das moléculas íntegras que compõem cada fração extraída, foram feitas cromatografias descendentes em papel Whatman no. 1 (24 horas). O material hidrolisado de cada fração também foi analisado quanto a sua composição monossacarídica por cromatografia em papel Whatman no. 1 utilizando-se padrões conhecidos. Foram utilizados dois tipos de solventes na corrida das cromatografias: *n*-butanol:piridina:H₂O (1:1:1) ou *n*-butanol:piridina:H₂O (5:3:3) (HOUGH & JONES, 1962).

A revelação das cromatografias foi feita pela detecção dos açúcares com soluções de AgNO₃:Acetona (1:250 v/v), NaOH (40%):EtOH (1:25 v/v) e tiosulfato de sódio 5% (p/v), de acordo com o método descrito por TREVELYAN *et al.*, (1950). Para a detecção de açúcares redutores, as cromatografias foram reveladas por cloridrato de *p*-anisidina:butanol 4% (p/v) como descrito por HOUGH *et al.*, (1950).

3.5.6. Análise de Ácidos Graxos

As frações lipídicas foram caracterizadas segundo sua composição glicídica e de ácidos graxos. Uma amostra de cada fração (5 mg) foi metanolizada sob refluxo em solução de HCl 3% em MeOH por 2 horas a 100°C para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (MORRISON, 1986). Foi adicionado AgCO₃ para neutralizar o HCl. O precipitado foi removido e os ácidos graxos éster metílicos foram separados através de uma partição entre H₂O e CHCl₃ e analisados e quantificados em GC-MS (coluna DB 23 – 50°C a 250°C – 40°C min⁻¹) comparando-se seus perfis de fragmentação.

3.6. Caracterização Estrutural

3.6.1. Acetilação para Análise em Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

A composição monossacarídica dos oligo e polissacarídeos de cada fração obtida foi determinada por análise através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS – coluna DB 225 a 50°C até 250°C – 40°C min⁻¹). O material a ser analisado foi hidrolisado como descrito anteriormente, seguido de redução com boridreto de sódio (NaBH₄) por 12 horas e então acetilados com anidrido acético por 1 hora a 120°C (WHITON et al., 1985).

3.6.2. Metilação para Análise em Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

Alíquotas do material foram metiladas segundo o método descrito por CIUCANU & KEREK (1984) adicionando-se cerca de 1ml de DMSO e NaOH rigorosamente seco e agitando-se em vortex para a solubilização. Adicionou-se ao meio iodeto de metila (CH_3I) para a reação de substituição e metilação das moléculas. Ao término do processo, gelo e gotas de H_2SO_4 0,5 N são adicionados para neutralizar a solução que foi então dialisada. O material foi então hidrolisado e processado como descrito acima para sua acetilação e análise no GC-MS.

3.6.3. Carboxirredução de Polissacarídeos Ácidos

Polissacarídeos ácidos encontrados nas amostras obtidas de *S. cytherea* sofreram carboxirredução com carbodiimida segundo TAYLOR & CONRAD (1972), para neutralizar os terminais carboxílicos dos ácidos urônicos. Aproximadamente 20mg de material foram dissolvidos em tampão MES com posterior adição de carbodiimida, agitando por 1 hora com posterior adição de tampão TRIS até pH 7,0. Boridreto de sódio (NaBH_4) foi adicionado e o material reduzido "overnight". O material é então neutralizado com HCl até pH 5,0 e dialisado exaustivamente para a retirada do NaBH_4 e HCl.

3.6.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os carboidratos foram caracterizados estruturalmente utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C realizados em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 com frequência de 100 MHz com tubos de quartzo de 150m de comprimento e 5 mm ou 10 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ). O solvente utilizado foi D_2O e acetona (δ 30,2) foi utilizada como padrão interno das análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento das Frações

Após a liofilização da polpa da fruta de *Spondias cytherea* (cajá), 36g da polpa seca foram utilizadas na realização de extrações sucessivas com diferentes solventes para que fossem obtidas diversas frações de material glicídico (Figura 02).

Grande parte do material (88,4%) foi removido durante os processos de extrações deixando pouco resíduo que não foi extraído com nenhum dos solventes utilizados, sendo então, descartado. Do material extraído, observa-se que mais de três quartos (~77%) são compostos de baixo peso molecular retirados nas primeiras extrações. O restante (~17%) são compostos polissacarídicos, ou seja, material de peso molecular mais elevado. O material extraído na extração aquosa foi precipitado em etanol e centrifugado (10 min, 15°C a 12.000 rpm), as frações resultantes foram: Sobrenadante Etanólico da extração Aquosa (sbn EtOH) e Precipitado Etanólico da extração Aquosa (ppt EtOH). Com o material precipitado da fração aquosa (ppt EtOH) foi feito um tratamento com HCl (pH 2,0) para separar os polissacarídeos neutros dos ácidos. Este tratamento forneceu outras duas subfrações: Sobrenadante HCl do Precipitado EtOH (sbn HCl) e Precipitado HCl do Precipitado EtOH (ppt HCl). O peso e o rendimento das frações obtidas durante as extrações seqüenciais são mostrados na Tabela 01.

Tabela 01 – Peso e rendimento das frações obtidas através de extrações sucessivas da polpa do fruto de *Spondias cytherea*.

Frações	Peso (g)	Rendimento (%)	Rendimento Total	
Peso inicial: 36g				
CHCl₃:MeOH (2:1)	6,9	19,2		
Acetônico	1,1	3,1	76,6%	A
Etanólico	8,3	23,2	(27,5g)	
Sbn EtOH	11,2	31,1		
Ppt EtOH	2,3	6,4		
Sbn HCl	1,8	5,1	17,3%	B
Ppt HCl	0,3	0,9	(6,2g)	
KOH 2%	1,6	4,3		
KOH 10%	0,2	0,6		
TOTAL	33,7	93,9		

A Material de baixo peso molecular. **B** Material de alto peso molecular.

A porcentagem de material de baixo peso molecular encontrada na polpa da fruta de cajá é muito elevada, diferente da maioria dos materiais estudados que apresentam muito material de peso molecular elevado em relação a compostos de menor peso. Aproximadamente 20% do material foi extraído com os solventes CHCl₃:MeOH (2:1 v/v) e Acetona. Estes extratos apresentam grande quantidade de material lipídico o que explica a alta insolubilidade desta polpa em água na preparação de sucos e doces. Este dado foi facilmente confirmado com a utilização de 3g da polpa seca de cajá que foram solubilizados em água e centrifugados por 5 minutos a 10.000rpm. O precipitado e o sobrenadante foram então secos e pesados mostrando que aproximadamente 20% do material (0,62g) mostrou-se insolúvel em água. O restante do material (2,38g - ~80%) foi considerado solúvel.

Uma pequena fração da polpa integral seca foi utilizada na quantificação de glicídios totais e ácidos urônicos para a obtenção de um dado básico inicial. O resultado destas quantificações mostrou que a polpa integral seca apresenta 46% de açúcares e 2,8% de ácidos urônicos.

4.2. Detecção e Quantificação Monossacarídica das Frações

A presença de material glicídico nas frações foi evidenciada através de cromatografia descendente em papel Whatman no. 1 (solvente: *n*-butanol:piridina:água – 1:1:1) e revelação com AgNO₃ (Figura 03). Este método mostrou-se eficiente na evidenciação de oligos e monossacarídeos presentes nas frações que apresentavam compostos de baixo peso molecular. A presença de polissacarídeos não pôde ser evidenciada desta forma uma vez que estas moléculas apresentam um peso molecular muito elevado e permanecem na linha de base da corrida cromatográfica. As frações foram então submetidas à hidrólise ácida com TFA 2M (100°C – 8h) para que as unidades monossacarídicas fossem separadas e uma nova cromatografia em papel foi realizada, desta vez mostrando os monossacarídeos presentes em cada fração, inclusive nas frações polissacarídicas (Figura 04).

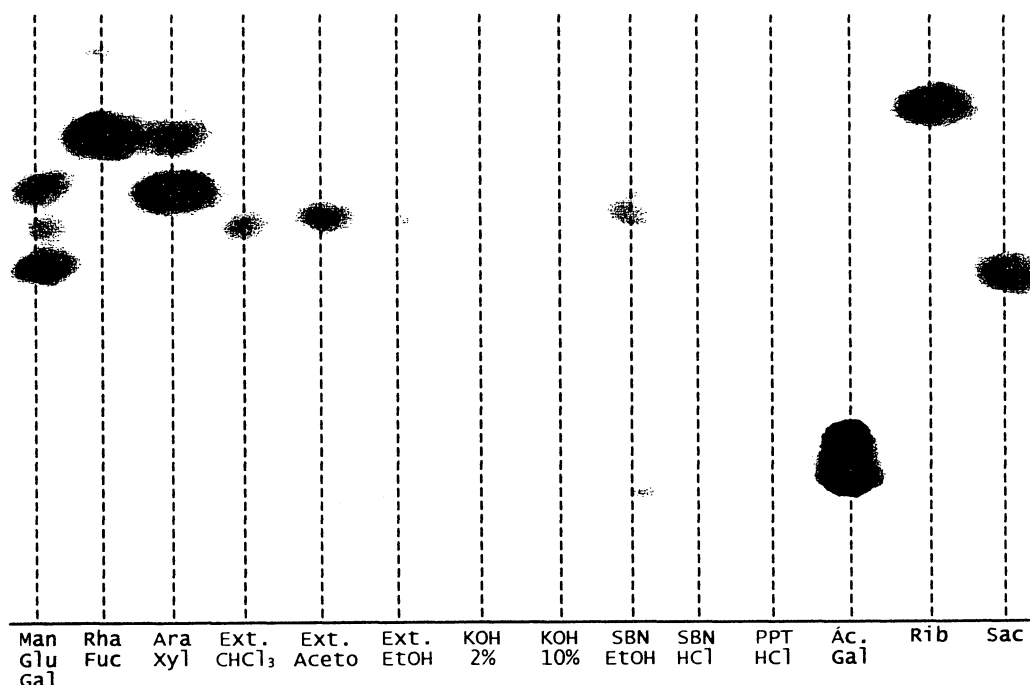


Figura 03 – Cromatografia em Papel das frações não hidrolisadas obtidas de *S. cytherea* revelada com AgNO₃ (solvente: *n*-butanol:piridina:água – 1:1:1).

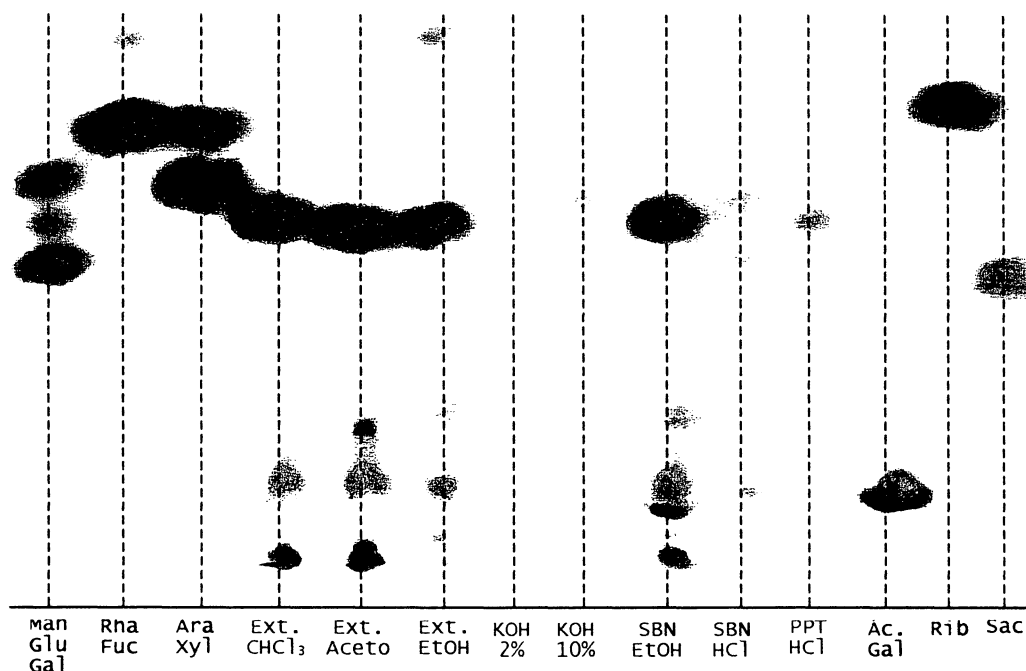


Figura 04 – Cromatografia em papel das frações hidrolisadas obtidas de *S. cytherea* revelada com AgNO_3 (solvente: *n*-butanol:piridina:água – 1:1:1).

Para a confirmação da composição monossacarídica das frações principais foi realizada uma análise em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS). As frações sbn HCl, ppt HCl, sbn EtOH, KOH 2%, KOH 10% e o extrato etanólico foram hidrolisados (TFA 2M – 100°C – 8h), reduzidos com NaBH_4 (25°C – 12h) e acetilados com anidrido acético (120°C – 1h) formando assim os alditóis acetatos dos respectivos monossacarídeos presentes em cada fração capazes de se volatilizarem na coluna gasosa do cromatógrafo e serem analisadas conforme seu tempo de corrida e perfil de fragmentação no GC-MS. Os resultados obtidos desta análise são apresentados na Tabela 02.

Tabela 02 – Composição monossacarídica das frações obtidas de *Spondias cytherea* segundo análise em GC-MS

Monossacarídeos ^a	FRAÇÃO					
	KOH 2%	KOH 10%	Ext. EtOH	Sbn EtOH	Ppt HCl	Sbn HCl
Ramnose	0,6	1,3	0,1	0,1	-	13,1
Fucose	-	-	-	-	-	0,9
Arabinose	35,6	46,9	-	1,3	4,7	40,6
Xilose	11,1	-	-	-	-	1,5
Manose	8,1	5,2	0,4	-	4,8	1,9
Galactose	32,3	45,6	-	-	12,4	23,6
Glucose	12,4	-	97,3	97,5	78,1	15,7
Inositol	-	-	1,2	1,8	-	-

^a Alditóis acetatos obtidos por hidrólise ácida, seguida de sucessiva redução e acetilação analisados por GC-MS (coluna DB-225) a 50°C até 250°C (40°C min⁻¹).

Não foi detectada a presença do monossacarídeos frutose nos testes cromatográficos e de fragmentação de massa, um dado interessante uma vez que este produto está entre os mais comumente encontrado nos vegetais. Também não foi detectada a presença do dissacarídeo sacarose nas cromatografias em papel (Figuras 03 e 04) outro açúcar característico de frutos.

4.3. Purificação dos Polissacarídeos

Foram recolhidas alíquotas das frações sbn HCl (1,4g), ppt HCl (0,3g) e KOH 2% (1,5g) e realizado um tratamento de gelo e degelo (G/DG) como passo inicial no processo de isolamento de seus polissacarídeos e pectinas componentes. Este tratamento gerou duas subfrações (sbn G/DG e ppt G/DG) para cada uma das frações trabalhadas. O peso e rendimento em porcentagem das subfrações obtidas está demonstrado na Tabela 03. Para facilitar a identificação das frações, foram dados nomes a cada uma delas também mostrados na Tabela 03.

Tabela 03 – Peso e rendimento das frações G/DG de *Spondias cytherea*.

FRAÇÃO	SUBFRAÇÕES G/DG	PESO (g)	RENDIMENTO (%)
Sbn HCl	Ppt G/DG PAPS ^a	0,18	12,8
	Sbn G/DG SASS ^a	1,22	87,2
Ppt HCl	Ppt G/DG PAPP ^a	0,24	80,0
	Sbn G/DG SASP ^a	0,06	20,0
KOH 2%	Ppt G/DG PAPK2 ^a	0,53	35,3
	Sbn G/DG SASK2 ^a	0,97	64,7

^a Nome dado às frações para facilitar sua identificação.

Para a detecção de amido foi utilizado o reativo de lugol nas frações sbn HCl, ppt HCl e KOH 2%. Como já era previsto, o resultado da reação foi positivo, mostrando que as frações continham amido. Desta forma todas as subfrações do processo de G/DG, exceto a subfração SASP, por conter pouco material, foram submetidas a um tratamento com amilase (37°C overnight) para degradar o amido principalmente em suas unidades dissacarídicas de glucose (maltose). Cada subfração foi então dialisada para a retirada dos oligossacarídeos. O peso de cada subfração antes e após o tratamento com amilase e a porcentagem de amido presente em cada uma delas estão demonstrados na Tabela 04.

Tabela 04 – Porcentagem de amido em cada subfração G/DG

SUBFRAÇÃO	PESO (g)		AMIDO (%)
	Antes do Tratamento com Amilase	Depois do Tratamento com Amilase	
PAPS	0,18	0,13	17,0
SASS	1,22	1,05	10,1
PAPP	0,24	0,18	0,1
SASP ^a	0,06	-	-
PAPK2	0,53	0,48	8,5
SASK2	0,97	0,27	71,3

^a A porcentagem de amido na fração SASP não foi quantificado devido a pouca quantidade de material.

4.3.1. Caracterização Estrutural do Polissacarídeo

A fração SASS foi a fração contendo polissacarídeos escolhida para dar continuidade aos experimentos e ser caracterizada estruturalmente por apresentar a maior quantidade de material. Desta forma, 3mg de SASS, agora destituída de amido, foram hidrolisados, reduzidos e acetilados para serem analisadas em GC-MS e comparadas com os dados anteriores. Esta fração apresentou uma composição monossacarídica composta principalmente de Ara, Gal, Glc e Rha numa razão molar de 41:33:15:10. Contudo, suspeita-se que a porcentagem de glucose detectada seja algum resíduo de amido remanescente, da amostra devendo portanto ser desconsiderado. O material SASS foi então levado para análise de homogeneidade em GPC e os gráficos de espalhamento de luz e índice de refração são mostrados na Figura 05.

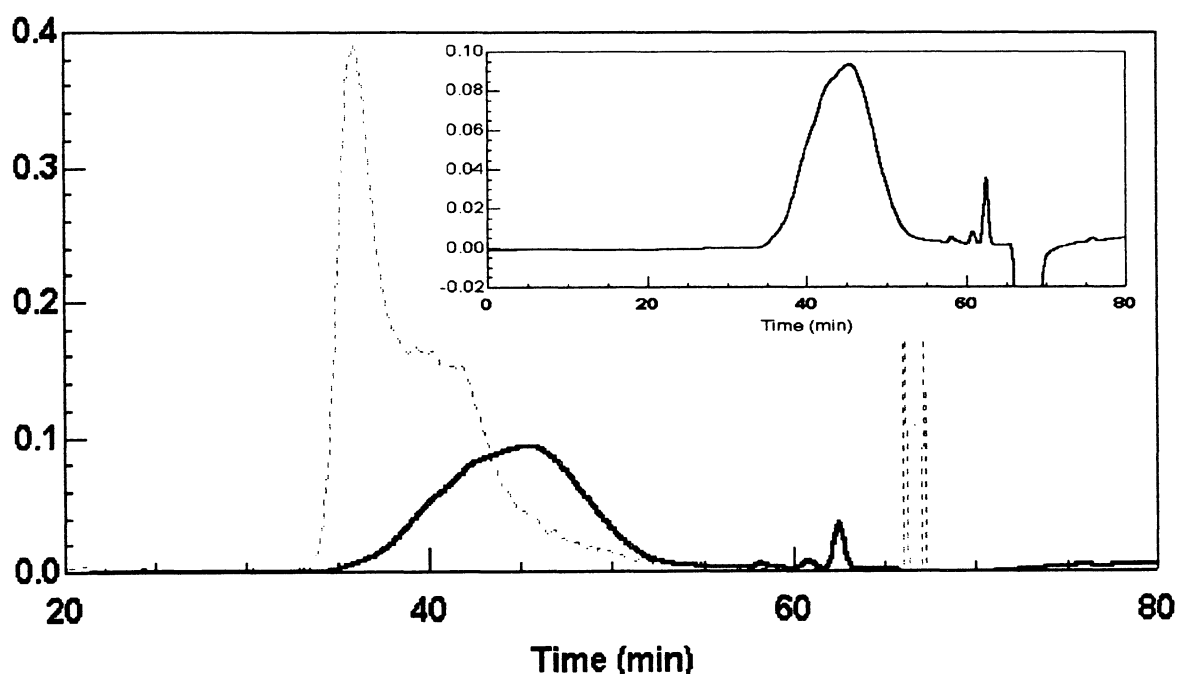


Figura 05 – Análise de GPC do material SASS. (—) Índice de refração; (---) Espalhamento de luz. Detalhe da análise de índice de refração mostrado no canto superior direito.

Uma parte do material de SASS foi solubilizada em D₂O e levada para análise em RMN. O espectro de RMN de ¹³C é mostrado na Figura 06 e mostra uma mistura de polissacarídeos possivelmente uma pectina e uma arabinogalactana. Pode-se observar a presença de grupos ácidos da carbonila na fração devido aos sinais presentes em campo baixo (170 a 174 ppm). A presença de um sinal bem pronunciado em δ 52,86 evidencia a presença de um grupo O-metil presente na fração.

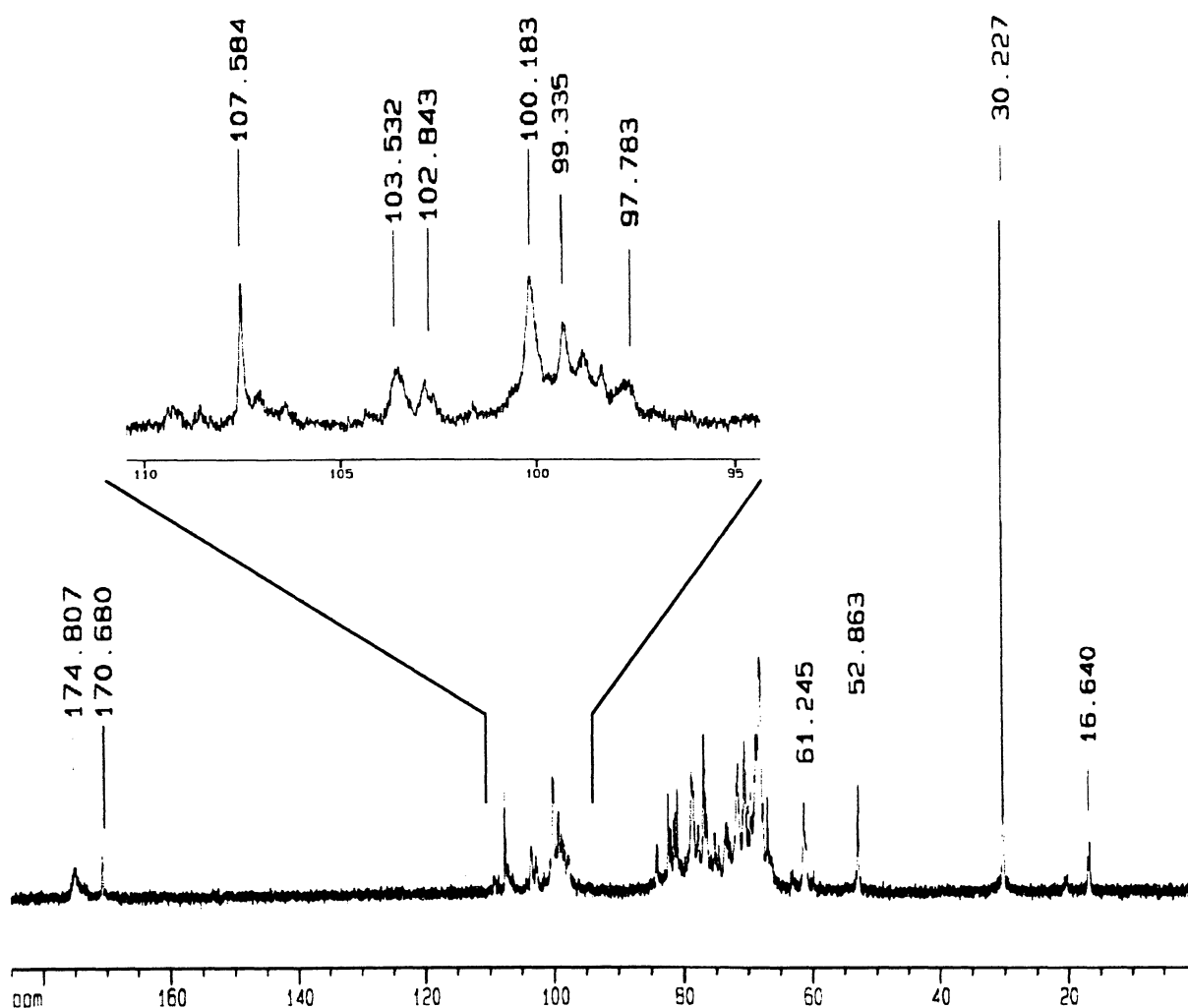


Figura 06 – Espectro de ¹³C-RMN da fração SASS. A região de carbono anomérico está mostrada em detalhe. (padrão interno de acetona: δ 30.23)

Uma análise de metilação (CIUCANU & KEREK, 1984) foi realizada utilizando-se a fração SASS que foi posteriormente analisada em GC-MS. Os derivados O-Me-alditol acetados encontrados são mostrados na Tabela 05.

Tabela 05 – Análise dos O-Metil-alditol acetatos obtidos da fração SASS

O-Me-alditol acetatos ^a	% de O-Me-alditol acetato		
	Rt ^b	Fração SASS	Tipo de Ligação
2,3,5-Me ₃ -Ara	7:46	22,1	Araf-(1→
2,5-Me ₂ -Ara	9:48	8,5	3→)-Araf-(1→
2,4-Me ₂ -Rha	10:03	7,4	3→)-Rhap-(1→
2,3-Me ₂ -Ara	10:36	9,8	5→)-Araf-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	11:05	15,3	Glc _p -(1→
3-Me-Rha	12:36	2,9	2,4→)-Rhap-(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	14:38	13,3	4→Gal _p -(1→
2,3-Me ₂ -Gal	22:45	19,7	4,6→)-Gal _p -(1→

^a O polissacarídeo foi metilado segundo Ciucanu & Kerek (1984).

^b Tempo de retenção (Rt) em minutos; 50°C a 220°C (40°C min⁻¹).

A fração SASS foi posteriormente aplicada em uma coluna de DEAE-Sepharose para a separação de polissacarídeos carregados e neutros. As eluições foram feitas com NaCl (0,1 e 1,0M) e NaOH (1,0M) resultando portanto em 3 frações. A fração eluída com NaCl 1,0M apresentou o melhor rendimento e assim foi submetido para análise em RMN. O espectro de RMN de ¹³C é mostrado na Figura 07. Utilizou-se esta amostra para uma quantificação de ácido urônico da fração utilizando o método descrito por BLUMENKRANTZ (1973). O resultado da quantificação mostrou uma molécula contendo 85% de ácido urônico.

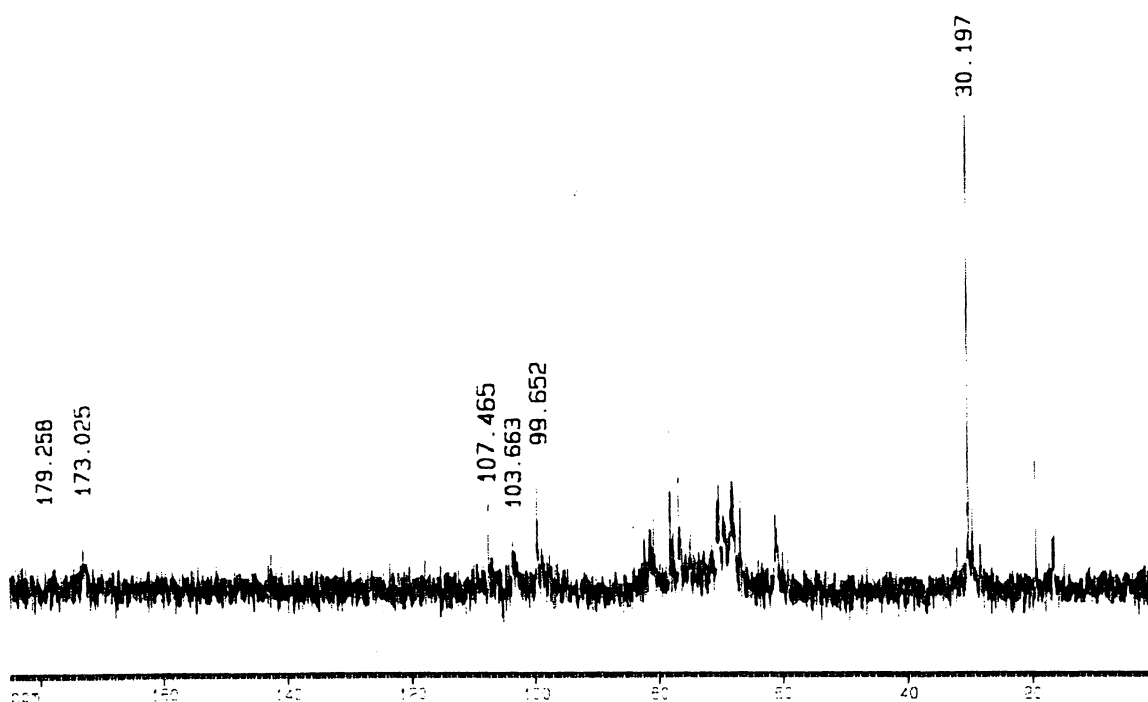


Figura 07 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração eluída em coluna de DEAE-Sepharose com NaCl 1,0M (padrão interno de acetona: δ 30.197)

4.4. Carboidratos de Baixo Peso Molecular

O extrato aquoso sofreu precipitação etanólica (3v/v) e o sobrenadante etanólico (SBN EtOH) deste tratamento foi recolhido para que fosse realizada a análise dos oligossacarídeos presentes nesta fração. O espectro de RMN de ^{13}C mostra os sinais em ppm (δ) encontrados na fração SBN EtOH (Figura 08). Uma análise comparativa dos sinais encontrados no SBN EtOH com os sinais apresentados pela sacarose (Glup 1 \rightarrow 2 Fru f) comprova a ausência deste na fração (detalhe Figura 08), como previsto nas cromatografias em papel (Figuras 03 e 04), um dado interessante, uma vez que este dissacarídeo é um dos principais açúcares encontrados em frutos.

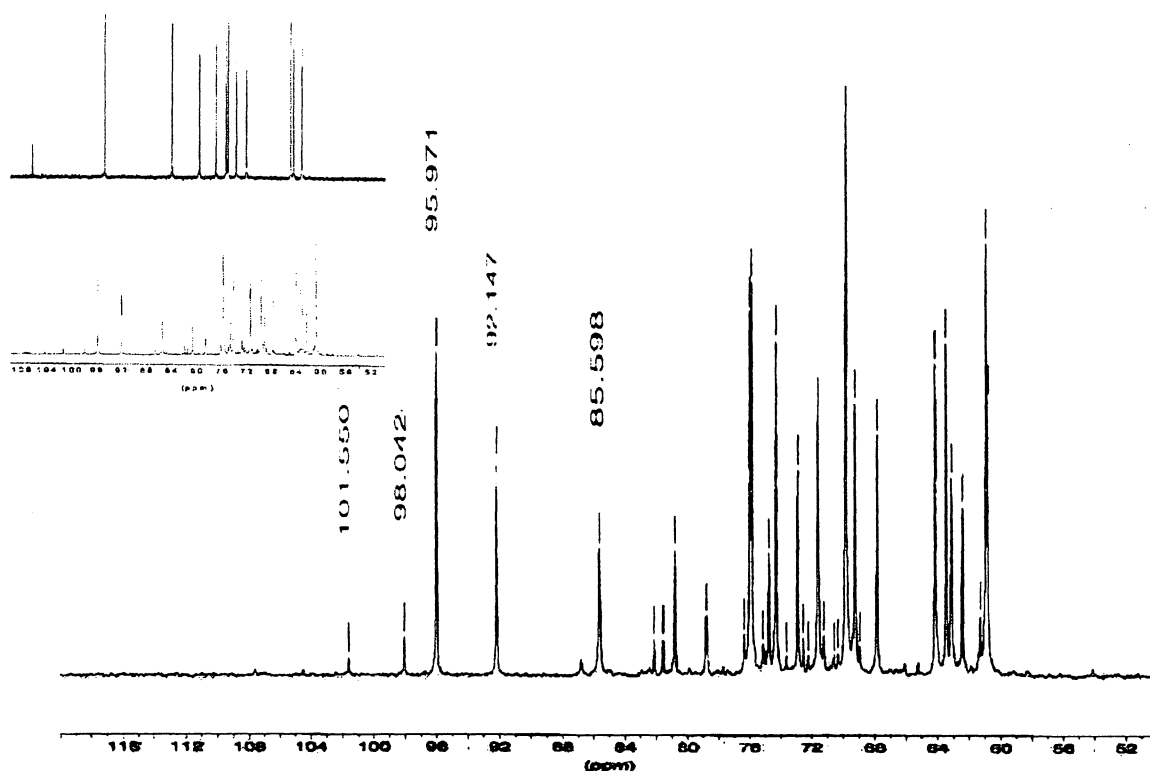


Figura 08 – Espectro de RMN de ^{13}C do sobrenadante etanólico (SBN EtOH). Comparação do espectro obtido de SBN EtOH (vermelho) e do espectro de ^{13}C -RMN da sacarose (azul).

Um fracionamento da fração SBN EtOH foi realizado utilizando-se uma coluna de carvão ativo:celite (1:1 p/p) e eluições com água e concentrações crescentes de etanol até que cada eluição fosse negativa ao teste do $\text{PhOH}:\text{H}_2\text{SO}_4$. As frações recolhidas da coluna foram então hidrolisadas, reduzidas e acetiladas para análise em GC-MS. A composição monossacarídica encontrada em cada nova fração está mostrada na Tabela 06.

Tabela 06 – Composição monossacarídica presente nas frações obtidas da coluna de carvão:celite do material SBN EtOH de *Spondias cytherea*.

Monossacarídeos ^a	Frações Obtidas da Coluna					
	Aquosa	EtOH 5%	EtOH 10%	EtOH 15%	EtOH 20%	EtOH 50%
Ramnose	-	1,82	-	1,69	3,36	2,18
Fucose	-	-	-	-	1,01	-
Arabinose	-	3,07	-	4,8	6,37	9,85
Manose	17,68	42,41	-	8,32	23,48	15,11
Galactose	-	3,15	-	2,64	3,35	16,47
Glucose	78,71	46,13	-	81,41	61,24	56,39
Inositol	3,61	3,42	-	1,19	1,58	-

^a Alditóis acetatos obtidos por hidrólise, seguida de sucessiva redução e acetilação analisados por GC-MS (coluna DB-225) a 50°C até 250°C (40°C min⁻¹). Não foi possível determinar a composição monossacarídica da fração EtOH 10%

Foi realizado um experimento para observar a presença de monossacarídeos livres naturalmente reduzidos (álcoois) na fração SBN EtOH. Foram separadas quatro alíquotas com 5 mg e cada uma recebeu um tratamento diferenciado para serem analisadas em GC-MS. A primeira alíquota foi somente acetilada utilizando-se anidrido acético por 1h a 120°C. A segunda alíquota foi reduzida com NaBH₄ overnight e acetilada da mesma forma que a primeira. As duas outras alíquotas foram hidrolisadas com TFA 2M por 8h, uma foi diretamente acetilada, a outra contudo foi reduzida com NaBH₄ antes da acetilação.

Os cromatogramas deste experimento obtidos através de análise em GC-MS são mostrados na Figura 09.

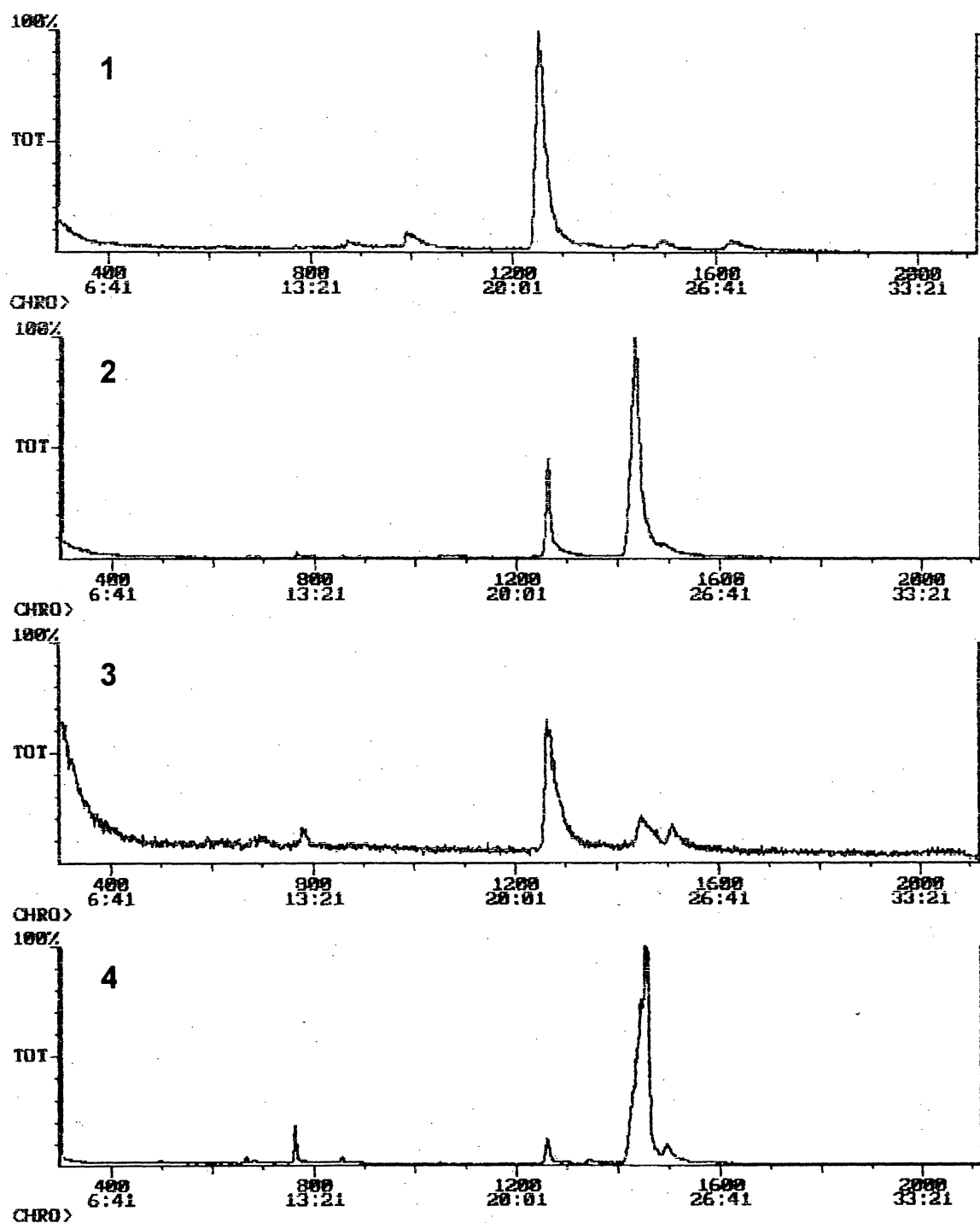


Fig. 09 – Cromatogramas obtidos em GC-MS por tratamentos diferenciados de quatro alíquotas da fração SBN EtOH. 1) acetilado; 2) reduzido e acetilado; 3) hidrolisado e acetilado; 4) hidrolisado, reduzido e acetilado. (Coluna DB-225 a 50°C até 250°C - $40^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Valores mostrados em porcentagem relativa.

Os cromatogramas mostram a presença do alditol manitol ($R_t \sim 21:00$ min) e glucose ($R_t \sim 23:50$ min) principalmente. O cromatograma 1 mostra a presença do alditol acetato da manose, evidenciando a presença de manitol livre na fração SBN EtOH. Um aumento na porcentagem de glucose quando o material foi reduzido e acetilado (2) em comparação ao material somente acetilado (1), mostra a presença de glucose livre não reduzida na amostra e, um aumento ainda maior observado no cromatograma 4, evidencia a presença de oligossacarídeos contendo glucose na fração que, contudo, não provém de sacarose, uma vez que a presença deste dissacarídeo foi descartada pela análise comparativa dos espectros da sacarose e da fração SBN EtOH em análise de RMN ^{13}C (Figura 08). A Tabela 07 mostra as porcentagens dos principais alditol acetatos encontrados nas análises das diferentes alíquotas da fração SBN EtOH.

Tabela 07 – Composição monossacarídica das alíquotas da fração SBN EtOH tratadas diferentemente

Monossacarídeo ^a	Alíquotas da Fração SBN EtOH			
	1	2	3	4
Arabinose			10,36 %	3,72 %
Manose	86,45 %	22,23 %	65,74 %	4,18 %
Glucose		77,16 %	15,03 %	87,88 %
Inositol			4,86 %	2,27 %

^a Alditóis acetatos dos monossacarídeos correspondentes analisados por GC-MS (coluna DB-225) a 50°C até 250°C (40°C min⁻¹). 1) acetilado; 2) reduzido e acetilado; 3) hidrolisado e acetilado; 4) hidrolisado, reduzido e acetilado.

4.5. Composição de Ácidos Graxos

A evidenciação química das frações contendo material lipídico foi iniciada por metodologia de metanólise onde 5mg dos extratos clorofórmico, acetônico e etanólico foram submetidos a análise da composição de ácidos graxos. Este processo liberou os metil-ésteres de ácidos graxos dos componentes lipídicos presentes nas frações (glicolipídeos, triglicerídeos, fosfolipídeos, etc) que foram então, submetidos a análise em GC-MS (coluna DB-23). Os ácidos graxos obtidos com seus respectivos tempos de retenção e fragmentos de massa são mostrados na Tabela 08.

Tabela 08 – Composição de ácidos graxos das frações lipídicas de *Spondias cytherea*

Ácido Graxo ^a	Rt ^b	% de ácidos graxos nas frações			Fragmentos de Massa (m/z)
		1 ^c	2 ^c	3 ^c	
C _{12:0} (dodecanóico)	6:50	0.6	-	-	214, 171, 143, 129, 74, 59, 43, 41
C _{14:0} (mirístico)	8:22	5.4	2.7	0.8	242, 199, 143, 129, 87, 74, 43, 41
C _{16:0} (palmítico)	10:28	45.8	42.3	10.0	270, 227, 185, 143, 74, 55, 43, 41
C _{16:1} (7-hexadecanóico)	10:49	2.8	2.8	0.4	268, 193, 165, 152, 74, 69, 55, 41
C _{17:0} (heptadecanóico)	11:37	0.4	1.0	0.1	284, 241, 199, 143, 129, 74, 43, 41
C _{18:0} (esteárico)	13:00	5.9	5.4	61.0	298, 255, 199, 143, 129, 74, 55, 41
C _{18:1} (oleico)	13:32	-	-	13.8	296, 264, 222, 180, 110, 97, 74, 41
C _{18:2} (linoleico)	14:14	23.5	31.4	5.9	294, 262, 217, 192, 95, 81, 67, 41
C _{18:3} (linolênico)	14:58	8.4	8.8	2.6	292, 263, 199, 173, 95, 79, 67, 41
C _{20:4} (aracdônico)	15:48	1.6	0.9	0.5	326, 297, 283, 269, 199, 143, 41
C _{22:0} (docosanóico)	19:16	3.5	2.8	1.6	354, 338, 311, 269, 199, 143, 41
C _{24:0} (lignocérico)	24:22	1.9	1.8	2.7	382, 339, 283, 199, 143, 74, 41

^a Ácidos graxos metil ésteres obtidos após metanólise e analisados por GC-MS (coluna DB-23)

^b Tempo de retenção (Rt) em minutos; 50°C a 220°C (40°C min⁻¹).

^c 1 extrato CHCl₃:MeOH (2:1, v/v); 2 extrato C=O(Me)₂; 3 extrato EtOH.

A análise de RMN de ^{13}C do extrato clorofórmio:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} - 2:1 \text{ v/v}$) mostrou a presença de muito pouco material glicídico no extrato. Os sinais que prevalecem são realmente os equivalentes aos componentes lipídicos da amostra. A região de campo mais baixo mostrada no espectro (170 a 180 ppm) mostra os sinais correspondentes as carbonilas terminais dos ácidos graxos livres. Pode-se também observar os sinais na região próxima a 130 ppm evidenciando a presença dos ácidos graxos insaturados, que encontram-se em quantidades relativamente altas nesta fração (~34%), e na região de campo mais alto (entre 10 e 45 ppm) nota-se a os sinais correspondentes aos carbonos das cadeias alifáticas dos ácidos graxos (fig. 10).

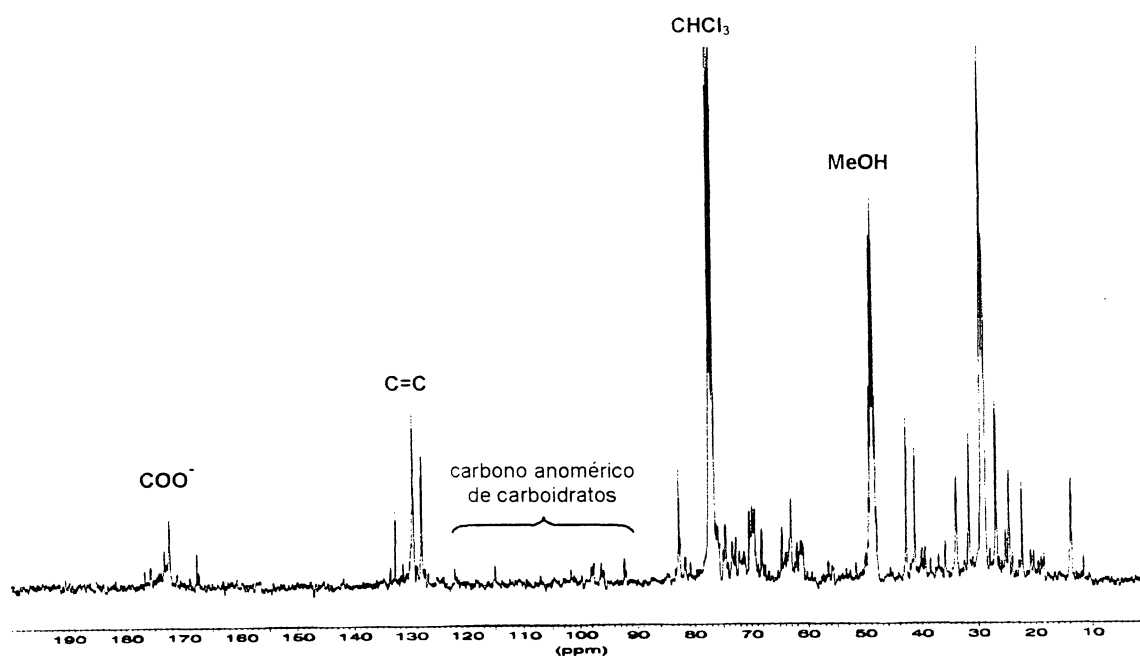


Fig. 10 – Espectro de RMN de ^{13}C do extrato $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1 v/v)

5. CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos neste trabalho são apresentadas as seguintes conclusões:

- a) Uma grande porcentagem do material contido na polpa do fruto de *Spondias cytherea* (~88%) foi retirada durante os processos de extração. Desta porcentagem total extraída, 76% são compostos por moléculas de baixo peso molecular e 12% constituídos por componentes de peso molecular elevado.
- b) A fração analisada contendo compostos de baixo peso molecular (sbn EtOH) é constituída principalmente por manitol e glucose livres e oligossacarídeos contendo glucose, porém não foi detectada a presença de sacarose na fração.
- c) O principal ácido graxo encontrado nas frações lipídicas após metanólise foi o ácido palmítico (C_{16:0}). Ácido esteárico (C_{18:0}) apresentou um alto rendimento na fração etanólica e o ácido graxo insaturado C_{18:2} (ác. linoleico) foi extraído principalmente nas frações clorofórmica e acetônica.
- d) A polpa integral de *Spondias cytherea* apresentou ~5% em peso de amido sendo que a maior parte do amido foi extraída na fração alcalina 2% cujo sobrenadante gelo/degelo apresentou 71% de amido.

- e) O polissacarídeo arabinogalactana encontrado apresenta-se como uma molécula ramificada com uma cadeia principal de galactose (1→4) e ramificações de arabinose. A quantidade deste polissacarídeo corresponde a menos de 1% em peso da polpa integral do fruto.
- f) A pectina extraída é composta por 85% de ácido galacturônico e possui ramificações de arabinofuranose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD M. J.; BERMEJO P.; CARRETERO E.; MARTÍNEZ-ACITORES C.; NOGUERA B.; VILLAR A.; - **Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela** - *Journal of Ethnopharmacology* - Volume 55 (1), December 1996, 63-68

ABO K.A.; OGUNLEYE V.O.; ASHIDI J.S.; - **Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*** - *Phytotherapy Research* - Volume 13 (6), 1999, 494-497

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G.; - **New method for quantitative determination of uronic acids** – *Anal. Biochem.* – Volume 54, 1973, 484-489

BOCK, K.; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H.; - **Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides** - *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* – Volume 42, 1984, 193-230

BRADFORD, M. M.; - **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding** - *Anal. Biochem.* - Volume 72, 1976, 248-254

CIUCANU, J.; KEREK, F.; - **A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates** - *Carbohydrate Research* - Volume 13, 1984, 209-217

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

GORIN, P.A.J.; - **Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides** – *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* – Volume 38, 1981, 13-104

HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; - **Chromatography on paper** - *Methods Carbohydr. Chem.* – Volume 1, 1962, 21-31

HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.H.; - **Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Par V. Improved methods for the separation and detection of sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram.** - *J. Chem. Soc.* - 1950, 1701-1706

KANDLER, O.; HOPF, H.; - **Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides** – *The Biochemistry of Plants* – Volume 3, 1980, 221-270

- KNEE, M. - Properties of polygalacturonate and cell cohesion in apple fruit cortical tissue - *Phytochemistry* - Volume 17, 1978, 1257-1260**
- KUBO, I.; OCHI, M.; VIEIRA., P.C.; KOMATSU, S.; - Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice – *J. Agric. Food Chem.* – Volume 41, 1993, 1012-1015**
- LEMOS, T. L. G.; NOGUEIRA, P. C. L.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; - Composition of the leaf oils of four *Spondias* species from Brazil - *J. Essent. Oil. Res.* - Volume 7, September 1995, 561-563**
- LINDBERG, B.; - Methylation analysis of polysaccharides. In: Methods in Enzymology - Volume 28, 1972, 178-195**
- MARQUES, M. R.; XAVIER-FILHO, J.; - Enzimatic and inhibitory activities of cashew tree gum exsudate - *Phytochemistry* - Volume 30, 1991, 1431-1433**
- MASSIOT, P.; BARON, A. FARHASMANE, L.; PARFAIT, A.; - Evolution of cell-wall polysaccharides of cythere plum (*Spondias cytherea*) in the extraction and clarification of juice - *Sciences des Aliments* - Volume 11 (3), 1991, 477-489**

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* - Volume 47 (5), 1998, 715-721

MORRISON, I.M.; - **Carbohydrate analysis: a practical approach** – In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. – Oxford: IRL-PRESS, 1986, 205-221

NELSON, D.L.; COX, M.M.; – 2000 – **Lehninger Principles of Biochemistry** – 3rd Ed. – Worth Publishers, NY - New York

NOTHNAGEL, E.A.; BACIC, A.; CLARKE, A.E.; - **Cell and developmental biology of arabinogalactan-proteins** – *Carbohydrate Polymers* – Volume 46 (3), 2001, 396

PAZUR, J. H.; - **Affinity chromatography of macromolecular substances on adsorbents bearing carbohydrate ligands.** In: TIPSON, R. S.; HORTON, D. (eds) - *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* - New York: Academic Press, 1981, Volume 39, 405-447.

PAZUR, J. H.; - **Oligosaccharides** In: PIGMAN, W; HORTON, D. (eds); *The Carbohydrates*, - 2^a.Ed, New York: Academic Press, 1970, Vol. 2A, 69-129

PINTO G. L.; MARTÍNEZ M.; BELTRÁN O.; RINCÓN F.; IGARTUBURU J. M.; -
Structural investigation of the polysaccharide of *Spondias mombin*
gum - *Carbohydrate Polymers* - Volume 43 (2), 2000, 105-112

PINTO, G. L.; MARTÍNEZ, M.; SANABRIA, L.; RINCÓN, F.; VERA, A.;
BELTRÁN, O.; CLAMENS, C.; - **The composition of two *Spondias* gum**
exudates - *Food Hydrocolloids* - Volume 14 (3), May 2000, 259-263

PRADYOT, K.; SWAPNADIP, T.; - **Structural features of the acidic**
polysaccharide of *Spondias pinnata* gum exudate - *Carbohydrate*
Research - Volume 98 (1), December 1981, 75-83

SCHAFFER, R.; - **Occurrence, Properties, and Preparation of Naturally**
Occurring Monosaccharides In: PIGMAN, W; HORTON, D. (eds); *The*
Carbohydrates, - 2^a.Ed, New York: Academic Press , 1972, Vol. 1A, 69-107

SOMOGYI, M.; - **A new reagent for the determination of sugars** - *J. Biol.*
Chem. - Volume 160, 1945, 61-68

TAYLOR, R.L.; CONRAD, H.E.; - **Stoichiometric Depolymerization of**
Polyuronides and Glycosaminoglycuronans to Monosaccharides
following Reduction of their Carbodiimide-Activated Carboxyl Groups -
Biochemistry, vol. 11, no. 8, 1972, 1383-1388