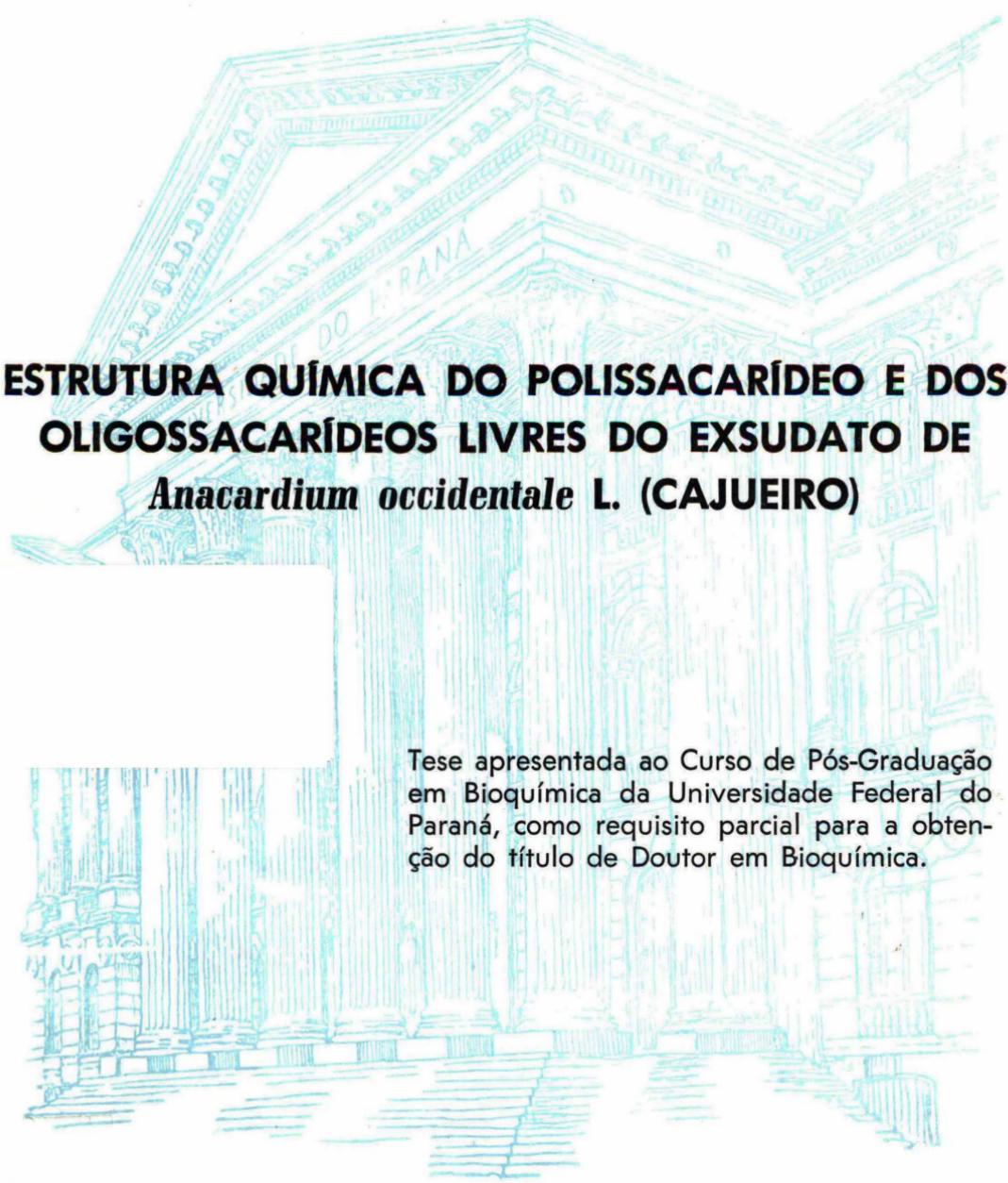


JULIANA MAURER MENESTRINA



**ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO E DOS
OLIGOSSACARÍDEOS LIVRES DO EXSUDATO DE
Anacardium occidentale L. (CAJUEIRO)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obten-
ção do título de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA

1999

JULIANA MAURER MENESTRINA

**ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO E DOS
OLIGOSSACARÍDEOS LIVRES DO EXSUDATO DE
Anacardium occidentale L. (CAJUEIRO)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obten-
ção do título de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA

1999

ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO E DOS OLIGOSSACARÍDEOS
LIVRES DO EXSUDATO DE *Anacardium occidentale* L. (CAJUEIRO)

por

JULIANA MAURER MENESTRINA

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica de Universidade Federal do
Paraná, pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Dr. PHILIP ALBERT JAMES GORIN – Orientador

Dra. JOANA LÉA MEIRA SILVEIRA GANTER - UFPR

Dra. MARIA DE LOURDES CORRADI C. DA SILVA - UNESP

Dra. ANITA HILDA STRAUS - UNIFESP

Dra. LUCIA PREVIATO - UFRJ

Curitiba, 15 de abril de 1999.

Orientadores: Prof. Dr. PHILIP ALBERT JAMES GORIN
Prof. Dr. MARCELLO IACOMINI

“Quero viajar até onde puder alcançar,
Quero atingir a alegria que reside em minha alma
E transformar os limites que me cercam
E sentir crescerem minha mente e meu espírito;

Quero viver, existir, *ser*,
E ouvir as verdades que existem dentro de mim.”

(Poema Novos Rumos, de DORIS WARSHAY)

Com amor, ao meu maior tesouro, meu filho, *Rodrigo*

Com saudade, à minha amiga eterna, *Janine*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Philip Albert James Gorin, pela sua orientação, participação e dedicação neste trabalho, além de seus inúmeros ensinamentos científicos e de sua amizade. Durante o período de realização desta tese, pude aprender com o Prof. Gorin, que a ciência faz parte da *alma*.

Ao Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela sua orientação, constante estímulo e apoio durante todo período de realização desta tese. Trabalhar com o Prof. Marcello fez aumentar a confiança, a estima e a amizade que sinto por ele.

Ao Prof. Dr. Christopher Jones pela colaboração e realização das análises em HPLC e dos experimentos de RMN dos oligossacarídeos livres redutores do exsudato vegetal de *A. occidentale* no National Institute for Biological Standards and Control, na Inglaterra.

À Profa. Dra. Mme Rinaudo e ao CERMAV - Centre de Recherche sur les Macromolécules Vegetales - CNRS - França, e pela realização da análise de cromatografia de exclusão estérica (SEC) acoplada a multidetectores do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de *A. occidentale*.

À Profa. Dra. Helena Simões Duarte, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela coleta e envio do exsudato vegetal de *A. occidentale* (cajueiro), proveniente do município de Caruaru (PE).

À Profa. Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte pela amizade, cumplicidade e exemplo de vida. Nem sempre podemos conviver com uma pessoa que é tão iluminada.

Ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá pela amizade, pelo convívio, pelos empréstimos de materiais e pelas trocas de conhecimentos. Agradeço muito por suas sugestões e suas correções na análise crítica da tese como membro examinador da Banca interna.

À Profa. Dra. Selma Faria Zawadzki-Baggio pela amizade, convivência, apoio e companherismo, durante todo o período de realização desta tese. Dividir a minha estrada profissional (e também a maternal) com a Selma, tornaram-nas mais enriquecidas.

À Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter pela sua amizade e sua alegria e irreverência de viver. Agradeço muito pelas suas sugestões e suas correções na análise crítica da tese como membro examinador da Banca interna.

Às Profas Dra. Fany Reicher e Dra. Maria Rita Sierakowski pelas análises dos relatórios de atividade e do projeto de tese, as quais foram importantes.

Aos Profs Drs. Aguinaldo Nascimento, Aníbal P. Campello, José Domingos Fontana, pelo bom-humor e convívio alegre. E com gratidão, em especial, ao Prof Dr. Manoel Francisco Guimarães pelo apoio constante e pela amizade sincera.

À minha amiga, doutoranda Joalice Oliveira Mendonça pela classificação taxonômica de *A. occidentale* e pelos conhecimentos recebidos sobre a Família Anacardiaceae.

À Profa Dra Tânia Bresolin e a Dra Carmen Lúcia O. Petkowicz pelo apoio na realização da análise de SEC, na França.

Aos colegas Eneida J. Daloce, Eliana Borba Carneiro, Fábio Pedroso, Hidevaldo Machado, Iara Machado, Luís Fernando Pereira, Ruth Schadeck, Sônia Ribeiro, pelo convívio durante esta etapa.

As colegas de laboratório Patrícia Maria Stuelp, Sandra Mara Woranowski-Barreira, Selene Lobo Elíffio e Sívia Regina Prado, pelos auxílios e pelo convívio. Em especial, a Cíntia Mara Ribas de Oliveira, pela presteza e ajuda relevantes, na impressão desta tese.

Aos amigos Alexandre Pinheiro Lima, Marco André Cardoso, Patrícia Lanzi Sassaki, Renato Boichichio, Prof. Ms. Luís Fernando Fávaro e Prof. Dr. Júlio César Ferreira, pelos alegres momentos que pudemos compartilhar.

Ao mestrando César Augusto Tischer, pela sua presteza e sua disponibilidade para realização das análises de CG-EM e de RMN, além, dos ensinamentos sobre RMN. Ainda, agradeço por sua amizade e pelas conversas sobre *psicanálise*.

Ao doutorando Guilherme Lanzi Sassaki, o qual foi muito importante durante este trabalho, pelos auxílios, pela presteza e pela amizade sincera. Agradeço, também, o seu tempo gasto na confecção das estruturas químicas dos oligossacarídeos e do polissacarídeo nativo, representados nesta tese.

Com carinho, aos meus alunos Rodrigo Arantes Reis, Fernanda Fogagnoli Simas e Simone Gräebin, pela ajuda, pelo companherismo e pela amizade. Com certeza, o maior lucro de ser professor é o que pode-se aprender.

Aos amigos e colegas de laboratório, Profs. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, Dra. Cirene L. Delgobo, Ms. Fabíola R. Stevan e Dr. Marcos José Machado, os quais compartilharam comigo esta etapa da minha vida, dividindo as alegrias e tristezas, porém, sempre com companherismo e sinceridade.

Ao Prof. Dr. Adauto Bellarmino de Pereira Netto, pela amizade sincera e pela oportunidade ímpar de compartilhar momentos de trabalho.

Ao Sérgio Luís Menestrina, meu marido, pelo apoio, pelo estímulo, pela compreensão e pela paciência, os quais foram importantes durante o período de realização desta tese. Agradeço as conquistas que pudemos realizar neste período.

À Eunice Bello Baron Maurer, minha mãe, o qual agradeço de todo meu coração o constante apoio, estímulo e dedicação, além, da sua ajuda imprescindível nos cuidados com o neto. Acredito que o mundo poderia ser melhor se todas as mães fossem como ela.

Às bibliotecárias Ruth, Isabella, Mariza e Telma, da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pelos auxílios da revisão bibliográfica e pela presteza dos serviços.

À Chefia, Sub-Chefia e aos funcionários do Departamento de Bioquímica, desta Universidade, pelo convívio.

À Coordenação e a Vice-coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica, desta Universidade, em especial aos Profs Dra. Maria Benigna de Oliveira Martinelli, Dr. Marcello Iacomini e Dra. Fany Reicher.

Ao CNPq, a CAPES e ao PRONEX-Carboidratos, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMO.....	xxvi
ABSTRACT.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE GOMAS.....	2
1.1.1 Gomas de exsudatos vegetais.....	3
1.2 DIFERENTES ASPECTOS UTILIZADOS PARA CLASSIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	4
1.3 POLISSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS VEGETAIS....	8
1.3.1 Família Mimosaceae.....	11
1.3.1.1 <i>Acacia senegal</i> e <i>Acacia verek</i>	11
1.3.1.2 <i>Anadenanthera colubrina</i>	12
1.3.2 Família Combretaceae.....	14
1.3.2.1 <i>Anogeissus latifolia</i>	14
1.3.3 Família Papilionaceae.....	15
1.3.3.1 <i>Astragalus</i>	15
1.3.4 Família Sterculiaceae.....	16
1.3.4.1 <i>Sterculia urens</i>	16
1.3.5 Família Anacardiaceae.....	17
1.3.5.1 <i>Anacardium occidentale</i> L.....	17
1.3.5.2 <i>Lannea humilis</i> (Oliv.) Engler.....	24

1.3.5.3 <i>Lannea coromandelica</i>	25
1.3.5.4 <i>Spondias dulcis</i>	26
1.3.5.5 <i>Spondias pinnata</i>	27
1.3.5.6 <i>Spondias purpurea</i>	28
1.4 OLIGOSSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS VEGETAIS, DERIVADOS OU NATURAIS.....	29
1.4.1 Oligossacarídeos vegetais primários e secundários.....	30
1.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS.....	31
1.6 ALGUNS ASPECTOS SOBRE BIOSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS VEGETAIS.....	33
1.6.1 Estudos relacionados com biossíntese de polissacarídeos de exsudatos vegetais.....	35
1.7 JUSTIFICATIVAS.....	41
2. OBJETIVOS.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 MATERIAS E REAGENTES.....	45
3.2 EXSUDATO VEGETAL EM ESTUDO.....	45
3.3 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS LIVRES PRESENTES NO EXSUDATO VEGETAL DE <i>Anacardium</i> <i>occidentale</i>	47
3.4 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS LIVRES DO EXSUDATO VEGETAL DE <i>Anacardium occidentale</i>	48
3.5 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO NATIVO (PN) DO EXSUDATO VEGETAL DE <i>Anacardium occidentaie</i>	49
3.6 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO (PN) DO EXSUDATO VEGETAL DE <i>Anacardium occidentale</i>	51
3.7 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH.....	51
3.7.1 Polissacarídeo obtido por hidrólise ácida parcial (PPH).....	51

3.7.2 Polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i>	54
3.8 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO (PN) DO EXSUDATO VEGETAL DE <i>Anacardium occidentale</i>	57
3.9 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS.....	57
3.9.1 Determinação da configuração absoluta dos componentes monossacarídicos do polissacarídeo nativo.....	58
3.10 ANÁLISES DE METILAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	58
3.10.1 Metanólise de produtos <i>O</i> -metilados.....	59
3.10.2 Carboxi-redução dos polissacarídeos per- <i>O</i> -metilados.....	60
3.11 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	61
3.11.1 Cromatografia de partição em papel (CP) e em camada delgada (TLC).....	61
3.11.2 Cromatografia líquida gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)	61
3.11.2.1 Preparo das amostras para análise em CG-EM.....	62
3.11.3 Cromatografia de exclusão estérica (SEC) acoplada a multidetectores.	63
3.11.3.1 Determinação da massa molecular média ponderal em massa (M_w) e da massa molecular média em número (M_n).....	63
3.11.4 Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e derivatização dos oligossacarídeos livres por redução com 2-aminobenzamida.....	64
3.12 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO TREZE E PRÓTON (RMN- ^{13}C E RMN- ^1H).....	65
3.12.1 Oligossacarídeos livres.....	65

3.12.2 Polissacarídeos (PN, PPH, PPHDS1, PDS1, PDS2 e PDS3) e oligossacarídeos provenientes de hidrólise ácida parcial.....	66
3.13 ESPECTROMETRIA DE MASSA - ESI-MS (Electrospray-ionisation - mass spectrometry).....	66
3.14 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	67
3.14.1 Dosagem de açúcares totais.....	67
3.14.2 Determinação de ácido urônico.....	67
3.14.3 Determinação de proteína.....	68
3.15 POLARIMETRIA.....	68
3.16 MÉTODOS ANALÍTICOS ELEMENTARES.....	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1. CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR PRESENTES NO EXSUDATO DE <i>Anacardium occidentale</i> L. (CAJUEIRO).....	72
4.1.1 Quantificação dos monossacarídeos livres presentes no exsudato de <i>A. occidentale</i>	72
4.1.2 Purificação e determinação da composição monossacarídica dos componentes de baixa massa molecular presentes, livremente, no exsudato de <i>A. occidentale</i>	73
4.1.3 Caracterização estrutural da Fração F _{0,83}	80
4.1.4 Caracterização estrutural da Fração F _{0,79} e 0,70.....	93
4.1.5 Caracterização estrutural da Fração F _{0,50}	104
4.1.6 Caracterização estrutural da Fração F _{0,32}	111
4.2 POLISSACARÍDEO NATIVO DO EXSUDATO VEGETAL DE <i>Anacardium occidentale</i> L. (CAJUEIRO).....	125
4.2.1 Obtenção do polissacarídeo presente no exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	125
4.2.2 Homogeneidade e determinação da massa molecular da fração polissacarídica do exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	131

4.2.3 Caracterização estrutural do polissacarídeo obtido do exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	138
4.2.3.1 Determinação da composição monossacarídica do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	138
4.2.3.2 Determinação da configuração absoluta dos constituintes monossacarídeos do polissacarídeo nativo e da sua rotação ótica específica.....	142
4.2.3.3 Análise de metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	144
4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO DO EXSUDATO DE <i>A. occidentale</i> (PPH).....	156
4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DA DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DO POLISSACARÍDEO PARCIALMENTE HIDROLISADO (PPHDS1)..	161
4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS PELA DEGRADAÇÃO CONTROLADA SEQUENCIADA DE SMITH: PDS1, PDS2 E PDS3.....	164
4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO DO EXSUDATO VEGETAL DE <i>Anacardium occidentale</i>	177
4.6.1 Isolamento e composição monossacarídica dos oligossacarídeos obtidos a partir de hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo (PN).....	177
4.6.2 Caracterização estrutural da Fração FH _{0,14}	179
4.6.3 Caracterização estrutural da Fração FH _{0,32}	183
4.6.4 Caracterização estrutural da Fração FH _{0,86}	188
4.6.5 Caracterização estrutural da Fração FH _{1,15}	191
4.6.6 Caracterização estrutural da Fração FH _{1,30}	195
4.6.7 Frações FH _{1,00} e FH _{1,44}	206

4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	208
5. CONCLUSÕES.....	212
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	216
7. ANEXO - PUBLICAÇÃO.....	240

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Espécies de dicotiledóneas produtoras de exsudatos e a composição monossacarídica dos polissacarídeos constituintes.....	9
Tabela II	Informações estruturais e métodos de RMN.....	32
Tabela III	Rendimentos, R_{lact} e composição monossacarídica das frações obtidas após o procedimento de purificação dos carboidratos de baixa massa molecular do sobrenadante etanólico do exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	77
Tabela IV	Análise em HPLC das frações purificadas $F_{0,83}$, $F_{0,82}$, $F_{0,79}$ e $0,70$, $F_{0,50}$ e $F_{0,32}$ na forma de seus 2-aminobenzamida derivados.....	78
Tabela V	Assinalamentos (em δ ppm) da fração $F_{0,83}$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e 1H	89
Tabela VI	Assinalamentos (em δ ppm) da fração $F_{0,79}$ e $0,70$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e 1H	102
Tabela VII	Assinalamentos (em δ ppm) da fração $F_{0,50}$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e 1H	108
Tabela VIII	Assinalamentos (em δ ppm) da fração $F_{0,32}$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e 1H	119
Tabela IX	Comparação dos resultados obtidos, com relação, à homogeneidade, à determinação da massa molecular média ponderal em massa (M_w) e da [proteína] da fração polissacarídica presente no exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i> de diferentes regiões geográficas.....	137
Tabela X	Composição monossacarídica do polissacarídeo do exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i> obtido de diferentes regiões geográficas.....	139
Tabela XI	Composição monossacarídica e $[\alpha]_D^{25^\circ}$ obtidos para os polissacarídeos PN, PPH, PPHDS1, PDS1, PDS2 e PDS3.....	166

Tabela XII	Análise de metilação dos polissacarídeos: nativo (PN), parcialmente hidrolisado (PPH) e do obtido a partir da primeira degradação de Smith (PDS1).....	168
Tabela XIII	Sinais (em δ ppm) da região de C-1 dos espectros de RMN- ^{13}C dos polissacarídeos: PN, PPH, PPHDS1, PDS1, PDS2 e PDS3 e os assinalamentos dos respectivos carbonos.....	176
Tabela XIV	Composição monossacarídica das frações purificadas obtidas pela hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	178
Tabela XV	Assinalamentos (em δ ppm) da fração FH _{1,30} obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H	205

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Estrutura química de um fragmento do polissacarídeo obtido do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> (origem indiana), proposto por ANDERSON & BELL (1975).....	21
Figura 02	Diagrama esquematizado do possível local de síntese de material gomoso e seu transporte através da membrana.....	37
Figura 03	Exsudato vegetal obtido de <i>Anacardium occidentale</i> L. (cajeeiro).....	46
Figura 04	Esquema de obtenção dos carboidratos presentes no exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i>	50
Figura 05	Esquema da hidrólise ácida parcial do PN e do procedimento da degradação controlada de Smith do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPH).....	53
Figura 06	Esquema do procedimento da degradação controlada de Smith sequenciada do polissacarídeo nativo (PN).....	56
Figura 07	Perfil cromatográfico das frações obtidas em cromatografia de adsorção em carvão-terra de infusórios do sobrenadante etanólico do exsudato do cajueiro.....	74
Figura 08	Perfil cromatográfico, em cromatografia de camada delgada em celulose (TLC - celulose) das frações $F_{0,83}$, $F_{0,82}$, $F_{0,79}$ e $F_{0,70}$, $F_{0,50}$ e $F_{0,32}$	76
Figura 09	Perfil de eluição obtido em HPLC da fração $F_{0,83}$ na forma do derivado 2-aminobenzamida.....	80
Figura 10	Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz) da fração $F_{0,83}$, em D_2O , a 30°C	82
Figura 11	Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (500 MHz) da fração $F_{0,83}$, em D_2O , a 30°C	84
Figura 12	Espectro de RMN de correlação DQFCOSY [^1H - ^1H] da fração $F_{0,83}$, em D_2O , a 30°C	85
Figura 13	Espectro de RMN de correlação HMQC [^1H - ^{13}C] da fração $F_{0,83}$, em D_2O , a 30°C	87

Figura 14	Espectro de espectrometria de massa - ESI-MS da fração F _{0,83}	91
Figura 15	Perfil de eluição obtido em HPLC da fração F _{0,79} e 0,70 na forma do derivado 2-aminobenzamida.....	93
Figura 16	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz) da fração F _{0,79} e 0,70, em D ₂ O, a 30°C.....	95
Figura 17	Região de H-1 do espectro de RMN- ¹ H (500 MHz) da fração F _{0,79} e 0,70, em D ₂ O, a 30°C.....	97
Figura 18	Espectro de RMN de correlação TNDQFCOSY [¹ H- ¹ H] da fração F _{0,79} e 0,70, em D ₂ O, a 30°C.....	98
Figura 19	Espectro de RMN de correlação HMQC [¹ H- ¹³ C] da fração F _{0,79} e 0,70, em D ₂ O, a 30°C.....	100
Figura 20	Espectro de espectrometria de massa - ESI-MS da fração F _{0,79} e 0,70.....	103
Figura 21	Perfil de eluição obtido em HPLC da fração F _{0,50} na forma do derivado 2-aminobenzamida.....	104
Figura 22	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz) da fração F _{0,50} , em D ₂ O, a 30°C.....	106
Figura 23	Região de H-1 do espectro de RMN- ¹ H (500 MHz) da fração F _{0,50} , em D ₂ O, a 30°C.....	107
Figura 24	Espectro de espectroscopia de massa - ESI-MS da fração F _{0,50}	110
Figura 25	Perfil de eluição obtido em HPLC da fração F _{0,32} na forma do derivado 2-aminobenzamida.....	111
Figura 26	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz) da fração F _{0,32} , em D ₂ O, a 30°C.....	113
Figura 27	Região de H-1 do espectro de RMN- ¹ H (500 MHz) da fração F _{0,32} , em D ₂ O, a 30°C.....	116
Figura 28	Espectro de RMN de correlação TNDQFCOSY [¹ H- ¹ H] da fração F _{0,32} , em D ₂ O, a 30°C.....	117

Figura 29	Espectro de espectroscopia de massa - ESI-MS da fração F _{0,32}	120
Figura 30	Estruturas químicas dos oligossacarídeos livres redutores presentes no exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	122
Figura 31	Precipitação etanólica do exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i>	126
Figura 32	Descrição dos diferentes métodos para obtenção do polissacarídeo presente no exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	130
Figura 33	Perfil de eluição do polissacarídeo do exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i> , obtido pela cromatografia de exclusão estérica (SEC), usando detectores de difusão de luz (LS) e índice de refração (RI).....	132
Figura 34	Região de H-1 do espectro de RMN- ¹ H (400,13 MHz) do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i> , em D ₂ O, a 30°C.....	147
Figura 35	Espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) do polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> , em D ₂ O, a 30°C.....	148
Figura 36	Espectro parcial de RMN de ¹³ C-DEPT135 do polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> , em D ₂ O, a 30°C.....	150
Figura 37	Espectro parcial de RMN de ¹³ C-DEPT90 do polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> , em D ₂ O, a 30°C.....	151
Figura 38	Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz) do polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> de origem venezuelana, em D ₂ O, a 37°C, obtido por LÉON DE PINTO (1995).....	153
Figura 39	Espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido a partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> (PPH), em D ₂ O, a 30 °C.	159
Figura 40	Espectro parcial de RMN de ¹³ C-DEPT135 do polissacarídeo obtido a partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> , (PPH), em D ₂ O, a 30°C.....	160

Figura 41	Espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido a partir da degradação controlada de Smith do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPHDS1), em D ₂ O, a 30°C.....	162
Figura 42	Espectro parcial de RMN de ¹³ C-DEPT135 do polissacarídeo obtido a partir da degradação controlada de Smith do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPHDS1), em D ₂ O, a 30°C.....	163
Figura 43	Espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido da primeira degradação controlada de Smith do PN (PDS1), em D ₂ O com NaOH a 5% (p/v), a 30°C.....	170
Figura 44	Espectro parcial de RMN de ¹³ C-DEPT135 do polissacarídeo obtido da primeira degradação controlada de Smith do PN (PDS1), em D ₂ O com NaOH a 5% (p/v), a 30°C.....	171
Figura 45	Espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido da segunda degradação controlada de Smith sequenciada (PDS2), em D ₂ O com NaOH a 5% (p/v), a 30°C.....	172
Figura 46	Espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido da terceira degradação controlada de Smith sequenciada (PDS3), em D ₂ O com NaOH a 5% (p/v), a 30°C.....	172
Figura 47	Região de C-1 dos espectros de RMN- ¹³ C dos polissacarídeos: PN (A), PPH (B), PPHDS1 (C), PDS1 (D), PDS2 (E) e PDS3 (F).....	175
Figura 48	Região de C-1 do espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) da fração FH _{0,14} , em D ₂ O, a 30°C.....	180
Figura 49	Espectro parcial de RMN de ¹³ C-DEPT135 da fração FH _{0,14} , em D ₂ O, a 30°C.....	181
Figura 50	Região de H-1 do espectro de RMN- ¹ H (400,13 MHz) da fração FH _{0,14} , em D ₂ O, a 30°C.....	182
Figura 51	Espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) da fração FH _{0,32} , em D ₂ O, a 30°C.....	184
Figura 52	Espectro parcial de RMN de ¹³ C-DEPT135 da fração FH _{0,32} , em D ₂ O, a 30°C.....	185
Figura 53	Região de H-1 do espectro de RMN- ¹ H (400,13 MHz) da fração FH _{0,32} , em D ₂ O, a 30°C.....	186

Figura 54	Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração FH _{0,86} , em D ₂ O, a 30°C.....	188
Figura 55	Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 da fração FH _{0,86} , em D ₂ O, a 30°C.....	189
Figura 56	Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (400,13 MHz) da fração FH _{0,86} , em D ₂ O, a 30°C.....	190
Figura 57	Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração FH _{1,15} , em D ₂ O, a 30°C.....	192
Figura 58	Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 da fração FH _{1,15} , em D ₂ O, a 30°C.....	193
Figura 59	Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (400,13 MHz) da fração FH _{1,15} , em D ₂ O, a 30°C.....	194
Figura 60	Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração FH _{1,30} , em D ₂ O, a 30°C.....	196
Figura 61	Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 da fração FH _{1,30} , em D ₂ O, a 30°C.....	197
Figura 62	Espectro de RMN de correlação DQFCOSY [^1H - ^1H] da fração FH _{1,30} , em D ₂ O, a 30°C.....	199
Figura 63	Espectro de RMN de correlação TOCSY [^1H - ^1H] da fração FH _{1,30} , em D ₂ O, a 30°C.....	201
Figura 64	Espectro de RMN de correlação HMQC [^1H - ^{13}C] da fração FH _{1,30} , em D ₂ O, a 30°C.....	203
Figura 65	Espectro de RMN de correlação ROESY [^1H - ^1H] da fração FH _{1,30} , em D ₂ O, a 30°C.....	204
Figura 66	Estruturas químicas dos oligossacarídeos provenientes da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de <i>A. occidentale</i>	207

LISTA DE ABREVIATURAS

α	denota anomeridade alfa
β	denota anomeridade beta
δ	(delta), deslocamento químico
$[\eta]$	viscosidade intrínseca
$[\alpha]_D^{25^\circ}$	rotação ótica específica, a 25°C
2-AB	2-aminobenzamida
4-O-Me-GlcpA	ácido 4-O-metil glucurônico
AGPs	Arabinogalactana-proteínas
CG-EM	Cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa
COSY	Correlation NMR Spectroscopy
CP	Cromatografia de partição em papel
D-	Pertencente ao enantiômero da série D
D ₂ O	água deuterada
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DQFCOSY	Double Quantum Filtered Correlation NMR Spectroscopy
ESI-MS	Electrospray-ionisation mass spectrometry
F _{0.32}	Componente de baixa massa molecular presente no sobrenadante etanólico do exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i> , por exemplo, com R _{lact} de 0,32
FAB-MS	Espectrometria de massa acoplada ao rápido bombardeamento atômico
FH _{0.14}	Componente de baixa massa molecular resultante da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo do exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i> , por exemplo, com R _{lact} de 0,14
frações A, E30%, E50%	Frações obtidas a partir da cromatografia de adsorção em carvão-terra de infusórios do sobrenadante etanólico do exsudato vegetal de <i>Anacardium occidentale</i> , eluídas com água destilada, etanol aquoso 30% e 50%, respectivamente

GLC	cromatografia líquido-gasosa
Glc α A	ácido glucurônico
GPC	cromatografia de gel permeação
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
HPLC	cromatografia líquida de alta resolução
J	constante de acoplamento
L-	pertencente ao enantiômero da série L
Lact	Lactose
LS	(light scattering), difusão de luz
M _n	massa molecular ponderal média em número
mPas	Milipascal
m/z	relação massa/carga
M _w	massa molecular ponderal média em massa
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
p/v	peso por volume
PDS1, PDS2 e PDS3	polissacarídeos obtidos a partir da primeira, segunda e terceira, degradações controladas de Smith sequenciadas do polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> , respectivamente
PN	polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i>
PPH	polissacarídeo obtido a partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i>
PPHDS1	polissacarídeo obtido a partir da degradação controlada de Smith do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPH)
R _f	distância percorrida (cm) pela amostra em estudo dividida pela distância percorrida (cm) pelo solvente (em CP)
RI	índice de refração

R_{lact} e R_{rha}	distância percorrida (cm) pela amostra em estudo dividida pela distância percorrida (cm) pela lactose ou ramnose (amostra de referência) (em CP ou TLC)
RMN- ^{13}C	espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN- ^1H	espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
ROESY	Rotating-frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
SEC	cromatografia estérica acoplada a multidetectores
TLC	cromatografia de partição em camada delgada
TMS (Me_4Si)	tetrametil silano
TNDQFCOSY	Double Quantum Filtered Correlation NMR Spectroscopy, com pré saturação do solvente
TOCSY	Total Correlation NMR Spectroscopy
UV	detector de ultravioleta
v/v	volume por volume

RESUMO

O exsudato vegetal do *Anacardium occidentale* (cajueiro) de origem brasileira (Caruaru - PE) contém componentes de baixa massa molecular livres, como ramnose (0,005%), arabinose (0,03%), manose (0,007%), galactose (0,03%), glucose (0,02%), além de, oligossacarídeos redutores, como β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0,05%), α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-GlcpA (0,008%), α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0,01%) e α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0,008%), os quais foram caracterizados quimicamente, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A fração polissacarídica presente no exsudato do cajueiro (rendimento de 80%) foi analisada por cromatografia de exclusão estérica (SEC) acoplada a multidetectores, obtendo-se os valores para massa molecular média ponderal em massa (M_w) de $1,12 \times 10^5 (\pm 0,03)$ e para a massa molecular média ponderal em número (M_n) de $9,62 \times 10^4 (\pm 0,3)$. O grau de polidispersividade ($1,165 \pm 0,045$) obtido é característico de uma fração homogênea. O polissacarídeo nativo do cajueiro mostrou-se constituído por ácido glucurônico (5%), arabinose (4%), galactose (82%), glucose (6%), ramnose (2%) e xilose (1%). Não foi verificada a presença do derivado éter 4-metil glucurônico. Este polissacarídeo, caracterizado como uma heterogalactana ácida, é formado por uma cadeia principal de unidades de β -D-galactopiranosose unidas por ligação do tipo (1 \rightarrow 3), substituídas em O-6 por várias cadeias laterais. A partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo, foram caracterizadas estruturas das cadeias laterais, como, β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D- $\alpha\beta$ -Galp-, α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D- $\alpha\beta$ -Galp-, α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)-D- $\alpha\beta$ -Galp, β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Gal e β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp. As unidades redutoras de galactopiranosose fazem parte da cadeia principal do polissacarídeo. Além disso, pelos resultados apresentados sobre a estrutura química fina do polissacarídeo nativo do cajueiro, pode-se relatar que tanto os mono- como os oligossacarídeos livres redutores presentes no sobrenadante etanólico estariam presentes nas cadeias laterais desta molécula. Em virtude da similaridade entre os componentes de baixa massa molecular e as cadeias laterais do polissacarídeo nativo pode-se supor que os oligossacarídeos livres redutores seriam originados por enzimólise *in situ* ou de produtos intermediários de biossíntese deste polissacarídeo. Além disso, a hipótese de que essas moléculas serem originadas a partir de autohidrólise, poderia ser descartada, em virtude, da goma de cajueiro ser fracamente ácida e da resistência das ligações piranosídicas presentes no polissacarídeo.

ABSTRACT

The gum exudate of the Brazilian (Caruaru - PE) cashew nut tree (*Anacardium occidentale*) contained in the free state, rhamnose (0.005%), arabinose (0.03%), mannose (0.007%), galactose (0.03%), and glucose (0.02%). Also present were the reducing oligosaccharides β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0.05%), α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-GlcpA (0.008%), α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0.01%), and α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0.008%), which were principally characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The polysaccharide fraction present in the gum exudate was isolated (yield 80%) and analyzed by steric exclusion chromatography (SEC) coupled with multidetectors. Values were obtained for the apparent mass average molecular weight (M_w) of $1.12 \times 10^5 (\pm 0.03)$ and the apparent number average molecular weight (M_n) of $9.62 \times 10^4 (\pm 0.30)$. The degree of polydispersity (1.165 ± 0.045) obtained is characteristic of a relatively homogeneous fraction. The gum polysaccharide was composed of glucuronic acid (5%), arabinose (4%), galactose (82%), glucose (6%), rhamnose (2%), and xylose (1%). A suggested presence of 4-*O*-methyl glucuronic acid was not confirmed. This polysaccharide was characterized as an acidic heterogalactan, is constituted which has a main chain of (1 \rightarrow 3)-linked β -D-Galp units, substituted at O-6 by various side-chains. Partial hydrolysis data showed the side-chains to be composed of $-\beta$ -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D- $\alpha\beta$ -Galp-, $-\alpha$ -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D- $\alpha\beta$ -Galp-, α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)-D- $\alpha\beta$ -Galp-, β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp-, and β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp-, the reducing Galp units likely arising from those of the main-chain. This appears to also apply to the free, reducing oligosaccharides present in the gum. The free monosaccharides also correspond to units present in the side chains. The most likely explanations of the presence of the free reducing mono- and oligosaccharides are their formation via *in situ* enzymolysis of the polysaccharide or as biproducts in its biosynthesis. Considering the low acidity of the gum and the resistance of the pyranosyl linkages in the polysaccharide, autohydrolysis can be eliminated as a possibility.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE GOMAS

Considera-se gomas, moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas de alta massa molecular, usualmente com propriedades coloidais, as quais com apropriado solvente ou agente de inchamento podem produzir géis ou soluções altamente viscosas. Assim, o termo goma é aplicado a uma variedade de substâncias de características gomosas e não pode ser definido precisamente (WHISTLER, 1993a).

Substâncias hidrofóbicas muitas vezes chamadas de gomas são constituídas de hidrocarbonos de alta massa molecular e outros produtos derivados de petróleo, borrachas, certos polímeros sintéticos, chicle para goma de mascar, seivas resinosas como goma balsâmica (WHISTLER, 1993a).

Entretanto, mais comumente, o termo goma empregado tecnicamente na indústria, refere-se de maneira geral, a polissacarídeos vegetais ou de origem microbiana e seus derivados, os quais são dispersíveis tanto em água fria como em água quente, e produzem soluções ou dispersões uniformes em baixa concentrações (WHISTLER, 1993a). Neste caso, também estão sendo considerados os polissacarídeos incluídos na categoria chamada de mucilagens.

Dentre os mais utilizados estão os polissacarídeos de origem vegetal, tais como o amido, celulose e seus derivados, galactomananas, alginatos, pectinas, carragenanas, agarose, goma arábica e os de origem microbiana como a xantana e succinoglicana (MOORHOUSE, 1987).

1.1.1 Gomas de exsudatos vegetais

As gomas de exsudatos vegetais, são heteropolissacarídeos complexos (5 ou mais diferentes unidades de monossacarídeos) que podem ser produzidos, espontaneamente, pelo tronco das árvores, constituindo-se como parte do metabolismo normal da planta. Outras partes da árvore que podem exsudar são os galhos e os frutos (JONES, J.K.N. & SMITH, F. 1949).

Porém, geralmente, os exsudatos vegetais são produzidos por injúria mecânica decorrente do processo de poda das árvores ou pelo ataque direto de insetos ou microorganismos. Fungos e bactérias podem estimular a produção de goma de exsudato, resultando no processo conhecido como gomose, o que pode ser um sintoma característico de infecção microbiana. Não está esclarecido que sinais iniciam a síntese do exsudato, embora um número de substâncias tem sido empregadas para iniciar ou aumentar a sua produção, como por exemplo o etrel (ou ethephon; ácido 2-cloro-etil fosfônico) e o paraquat (herbicida). Pode-se supor, que a produção natural da goma de exsudato está sujeita a elicitores produzidos pela ação de patógenos ou pragas, sendo que sua produção parece estar relacionada com algum mecanismo protetor do vegetal (MARQUES & XAVIER-FILHO, 1991).

Dentro de muitas famílias de plantas, incluem-se espécies as quais exsudam gomas em maior ou menor grau. Gomas podem ser exsudadas em pequenas quantidades, não sendo perceptíveis ou podem ser produzidas abundantemente, formando até crostas. Plantas que produzem gomas de exsudatos comerciais são usualmente arbustos ou árvores pequenas, sendo que

as gomas tem aspecto vermiforme ou de gotas (WHISTLER, 1993a). As gomas são bastante puras quando coletadas logo que ocorre a exsudação pela planta. Porém, eventuais impurezas como casca e pó, que podem ser removidas quando em solução por centrifugação (WHISTLER & ROWELL, 1966).

1.2 DIFERENTES ASPECTOS UTILIZADOS PARA CLASSIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Neste item estão descritos diferentes aspectos que podem ser utilizados para classificar os polissacarídeos de maneira geral, porém, dar-se-á ênfase nos polissacarídeos de vegetais superiores. O termo “gomas vegetais” refere-se àqueles polissacarídeos que apresentam características gomosas, como descrito no item 1.1.

Para classificar as gomas vegetais são avaliadas características físicas (solubilidade e viscosidade) e químicas, como a acidez e o tipo de estrutura da molécula constituinte (SMITH, F. & MONTGOMERY, F., 1959). Com relação as gomas industriais, estas podem ser classificadas de acordo com a sua origem natural ou sintética (RODRIGUES *et al.*, 1993).

Considerando-se a acidez da molécula, tem-se as gomas ácidas (Grupo I), neutras (Grupo II) e básicas (Grupo III) (SMITH, F. & MONTGOMERY, F., 1959). Como exemplo de goma neutra pode-se citar, a goma guar, extraída de sementes da planta *Cyamopsis tetragonolobus* (Mimosaceae), que apresenta grande interesse comercial e com inúmeras aplicações estabelecidas. Esta goma é uma galactomanana, com relação manose:galactose de 1,8:1. A cadeia principal é

formada por unidades de D-manopirranose unidas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4), com substituição em O-6 por unidades de α -D-galactopirranose (STEPHEN, 1983; MAIER *et al.*, 1993).

Dentre as gomas ácidas, pode-se incluir as hemiceluloses, as gomas de sementes e as gomas de exsudatos.

As hemiceluloses são formadas principalmente por D-xilose, D-manose, D-glucose. D-galactose, L-arabinose, ácido D-glucurônico, ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ácido D-galacturônico, e em menor proporção L-ramnose e L-fucose. Sendo, que a cadeia principal é na sua maioria formada por unidades de β -D-xilopirranose unidas por ligações do tipo (1 \rightarrow 4), podendo ter ramificações de unidades de ácido D-glucurônico, ácido O-acetil-4-O-metil-D-glucurônico, ácido 4-O-metil-glucurônico e/ou L-arabinofuranose (WHISTLER & ROWELL, 1966). As unidades de xilopirranose podem apresentar-se acetiladas (REICHER *et al.*, 1989).

Dentre as gomas de sementes encontra-se estrutura química do tipo glucuronoxilana. Como por exemplo, na goma de sementes de *Salvia* sp. (Chia), constituída de unidades de β -D-xilopirranose, α -D-glucopirranose e ácido 4-O-metil- α -D-glucurônico (proporção 2:1:1) (BEMILLER *et al.*, 1993).

As gomas de exsudatos, em geral, apresentam como estrutura da cadeia principal unidades de D-galactopirranose, sendo que outros açúcares estão ligados a esta formando ramificações com múltiplas ou uma só unidades. As unidades de D-galactopirranose estão mais comumente ligadas em β -(1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6), com ambas as ligações frequentemente observadas no mesmo polissacarídeo. Entretanto, ligações do tipo (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 2) estão presentes em algumas estruturas de gomas. Muitas vezes, unidades de L-arabinofuranose e ácido D-

glucurônico ocorrem como cadeias laterais ou unidades terminais não-redutoras. Em muitas gomas, as unidades de ácido D-glucurônico não são 4-*O*-metiladas. As unidades de L-ramnopirranose são muitas vezes presentes na estrutura da goma como segmentos das cadeias principal ou lateral (WHISTLER & ROWELL, 1966; STEPHEN, 1983). Embora a xilose e manose tem sido encontrada em poucos casos, a galactose, arabinose, ramnose, ácido galacturônico, e glucurônico e/ou seu éter 4-metil são açúcares mais comumente encontrados (ANDERSON & BELL, 1975).

De acordo com a estrutura química da molécula constituinte, pode-se basear nas classificações estabelecidas para polissacarídeos (ASPINALL, 1969, 1983; STEPHEN, 1983).

Segundo ASPINALL (1969; 1983), os polissacarídeos contém estruturas características repetitivas que podem formar a base para a classificação da estrutura dessas moléculas. Podendo dividir os polissacarídeos, de diferentes origens, em dois principais grupos: homoglicanas e heteroglicanas. Nas homoglicanas incluem-se os polissacarídeos formados por um único açúcar constituinte, podendo ter um ou mais tipos de ligações. As diferenças entre os polissacarídeos pode ocorrer baseando-se no tamanho do anel, configuração anomérica, tipo de ligação, e ausência ou presença de ramificação. Na teoria um grande número de estruturas torna-se possível. Na prática, entretanto, as D-glucanas, são do grupo das homoglicanas, a estrutura mais abundante. Assim baseando-se nas cadeias internas dos heteropolissacarídeos, os polissacarídeos de exsudatos vegetais, estão incluídos no grupo das D-galactanas (sub-grupo arabinogalactanas tipo II), cuja cadeia interna é formada por unidades de

galactopirranose ligadas β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) e também no grupo das β -D-xilanas, constituído por unidades de D-xilopirranose. As heteroglicanas incluem os polissacarídeos constituídos por dois tipos de unidades sacarídicas dentro da cadeia principal. Dentre este grupo, os polissacarídeos de exsudatos vegetais, seriam incluídos nos grupos das glucuronomananas, em que a cadeia principal é constituída de moléculas de ácido glucurônico ligadas à unidades de manose, e no grupo das ramnogalacturonanas, cuja cadeia interna é formada por unidades de ácido D-galacturônico e L-ramnose.

Segundo STEPHEN (1983), baseando-se nas estruturas completas das moléculas, os polissacarídeos vegetais estariam classificados em cinco grandes grupos, como glucomanoglicanas, galactomananas, arabinogalactanas, galacturonanas e xilanas. Grande parte dos polissacarídeos de exsudatos vegetais seriam incluídos no grupo das arabinogalactanas, que incluem as galactanas ramificadas, substituídas em O-3 e O-6. Além disso, tais polissacarídeos podem ser incluídos nos grupos das galacturonanas, que apresentam na cadeia interna unidades de ácido D-galacturônico unidos por ligações do tipo (1 \rightarrow 4) e das xilanas, apresentando na cadeia principal unidades de D-xilose ligadas em (1 \rightarrow 4), podendo ocorrer substituições em O-2 por ácido 4-O-metil-glucurônico e em O-3 por L-arabinofuranose.

O conhecimento detalhado da estrutura química dos polissacarídeos torna-se necessário quando utiliza-se o tipo de estrutura química para classificar as gomas vegetais (ASPINALL, 1969, 1983 e STEPHEN, 1983).

1.3 POLISSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS VEGETAIS

As gomas de exsudatos são os mais complexos heteropolissacarídeos acídicos conhecidos, e a investigação de sua composição e estrutura apresentam uma formidável descoberta (ANDERSON & BELL, 1975).

A variedade de gomas de exsudatos já estudadas é muito grande para uma completa discussão em breve espaço (WHISTLER & ROWELL, 1966; ANDERSON & BELL, 1975). Em virtude disso, na Tabela I, estão listados alguns exemplos de espécies de dicotiledóneas produtoras de gomas de exsudatos, relacionando a família a qual pertencem e a composição monossacarídica dos polissacarídeos constituintes. As principais famílias (Divisão Angiospermae - Dicotiledóneas), produtoras de gomas de exsudatos descritas são: Anacardiaceae, Burseraceae, Cactaceae, Combretaceae, Mimosaceae, Meliaceae, Papilionaceae, Proteaceae, Rosaceae, Rutaceae, Sapotaceae, Sterculiaceae e Umbeliferae (BEAUQUESNE *et al.*, 1982).

Na Tabela I estão mostradas algumas espécies, que apresentam interesse comercial. Como por exemplo, a *Acacia senegal* e *A. vereck*, produtoras da goma arábica, *Anogeissus latifolia* produtora da goma ghatti, *Astragalus gummifer* produtora da goma tragacanto e *Sterculia urens*, produtora da goma karaia.

Tabela I: Espécies de dicotiledôneas produtoras de exsudatos e a composição monossacarídica dos polissacarídeos constituintes (Fonte: WHISTLER & ROWELL, 1966, com modificações)

Fonte/ Família	Composição Monossacarídica (%)						Outros
	D-Gal	L-Ara	D-GlcA	L-Rha	D-Glc	D-Xyl	
Anacardiaceae							
Anacardium occidentale L. (Índia)	61	14	6.2	7	8	2	manose (2)
Anacardium occidentale L. (Papua)	63	15	5.7	7	9		manose (1)
Lannea coromandelica (Houtt.) Merrill	70	11		2			ácidos galacturônico, glucurônico e 4-O-metil-glucurônico (17)
Lannea humilis Engl.	75	11		2			ácidos glucurônico e 4-O-metil-glucurônico (12)
Spondias cytheria Sonn.	+	+		+		+	ácido 4-O-metil glucurônico (+), L-fucose (tr.), O-metil-pentose (tr.)
Spondias dulcis	19.8	48.5					ácido galacturônico (20)
Spondias pinnata	47	23					ácido galacturônico (30)
Burseraceae							
Boswellia carteri Birdw.	58,3	8,3		+			ácido 4-O-metil glucurônico (33)
Commiphora myrrha Engl.	50	12					ácido 4-O-metil-glucurônico (38)
Cactaceae							
Opuntis fulgide Engelm.	25	50		tr		16	ácido galacturônico (8)
Opuntis megacantha Lehm.	46	38	13	11		tr.	
Combretaceae							
Anogeissus latifolia Wall.	31	42	11,5			4,5	D-manose (10), O-metil-pentose (1)
Combretum leonense Engl. et Diela	10	36		4			ácidos galacturônico e glucurônico (17,5)
Mimosaceae							
Acacia campylacantha Hochst.	54	29	7	8			ácido 4-O-metil-glucurônico (2)
Acacia catechu Benth.	+	+	+	+			
Acacia saligna (cyanophylla) Lindl.	49	7	24	20			
Acacia karroo Hayne	50	36	12	2			
Acacia mollissima (mearnsii) Willd.	42	42	9	7			
Acacia podalyriaefolia A. Cunn.	89,4	7,4	2,5	0,5			
Acacia senegal (L.) Willd.	39	28	17,5	14			ácido 4-O-metil-glucurônico (1,5)
Acacia sundra Spreng	42	28	18	14			
Acacia verec	52	19	16	14			
Albizzia zygia Macbrida	40	16	21	tr.			D-manose (13), ácido 4-O-metil-glucurônico (11)
Anadenanthera colubrina	20	63	10	6			D-manose (1)
Anadenanthera macrocarpa	24	67	7	2			

Fonte/ Família	Composição Monossacarídica (%)						Outros
	D-Gal	L-Ara	D-GlcA	L-Rha	D-Glc	D-Xyl	
<u>Mimosaceae (cont.)</u>							
<i>Caesalpinia eriostachys</i>	45	39	5				ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico (11)
<i>Cassia grandis</i>	30	10				16	ácido galacturônico (44)
<i>Cercidium praecox</i>	29	5				32	ácido galacturônico (34)
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	37	32	13	12			ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico (6)
<i>Lysiloma acapulcense</i>	69	13	10,5	4			ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico (3,5)
<i>Prosopis juliflora</i>	31	51					ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico (18)
<i>Senna nicaraguensis</i>	43	35	15				ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico (7)
<u>Meliaceae</u>							
<i>Khaya grandifolia</i> C.DC.	29,7	1		19,8			ácido D-galacturônico (39,6), ácido 4- <i>O</i> -metil -glucurônico (9,9)
<i>Khaya senegalensis</i>	+	+		+			ácido D-galacturônico (+), ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico (+)
<u>Papilionaceae</u>							
<i>Astragalus gummifer</i> Labill	4					40	ácido galacturônico (43), L-fucose (10%)
<i>Virgilia oroboides</i> (Berg.) Salter	45	38	8				ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico (+), manose (6)
<u>Proteaceae</u>							
<i>Grevilles robusta</i> A. Cunn.	45	38	17				
<i>Hakes scicularia</i> R. Br.	58	19	8			8	D-manose (7)
<u>Rosaceae</u>							
<i>Prunus armeniaca</i> L.	44	41	16				
<i>Prunus cerasus</i> L.	21	55	12			1,5	D-manose (10)
<i>Prunus domestica</i> L.	40	34	15	34			
<i>Prunus insititia</i> L.	30	38	16			3	D-manose (15)
<i>Prunus persica</i> (L.) Batach.	36	41					
<i>Prunus serrulata</i> Lindl.			7			93	
<u>Rutaceae</u>							
<i>Citrus limonia</i>	55	22	22				ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico
<i>Citrus maxima</i>	53	16	31				ácido 4- <i>O</i> -metil-glucurônico
<u>Sapotaceae</u>							
<i>Sapota echres</i> Mill.	16		30			54	
<u>Sterculiaceae</u>							
<i>Sterculia urens</i> Roxb.	+	+		+			ácidos urônicos (39,4)
<i>Sterculia setigera</i> Delile		28		22			ácido galacturônico (50)

Outras referências utilizadas: CAFFINI & PRIOLO DE LUFRANO (1974 e 1975); STEPHEN, (1983); ANDERSON *et al.*, (1990); LÉON DE PINTO *et al.* (1994). (+) → presente, porém, não quantificado; tr. → traços (< 1%).

Essas gomas de exsudatos são consumidas por diferentes indústrias, como de detergentes, têxtil, de adesivos, de papel, de tintas, alimentícia e de cosméticos, e nestas indústrias elas são usadas como agentes espessantes, gelificantes, emulsificantes, floculantes, clarificantes, encapsuladores, controladores de calor, estabilizador de espuma e de suspensão, entre outros (SANDFORD & BAIRD, 1983; BEMILLER, 1987; RODRIGUES *et al.*, 1993).

Serão descritas, a seguir, com mais detalhes, algumas espécies pertencentes as famílias Mimosaceae, Combretaceae, Papilionaceae, Sterculiaceae e Anacardiaceae.

1.3.1 Família Mimosaceae

1.3.1.1 *Acacia senegal* e *Acacia verek*

De acordo com os vários dados a respeito de exsudatos vegetais descritos na literatura, nota-se que as principais espécies estudadas pertencem a Família Mimosaceae (Classificação segundo Engler, antiga família Leguminosae).

A goma arábica corresponde ao exsudato produzido por pequenas árvores, pertencentes ao gênero *Acacia*. Existem cerca de 900 espécies de *Acacia*, que ocorrem em várias partes do mundo, porém, na África concentra-se as áreas produtoras da goma para utilização comercial. A goma arábica de alta qualidade é derivada da *Acacia senegal* e *Acacia verek*, que crescem nas regiões de Sudan e Senegal (WHISTLER & ROWELL, 1966; STEPHEN, 1983; WHISTLER, 1993b). Ela representa o polissacarídeo gomoso com ácido glucurônico mais abundante

comercialmente. Tem sido comercializada a 4.000 anos e hoje em dia é utilizada nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacéutica entre outras (BERGER & LESTER, 1962; WHISTLER & ROWELL, 1966; STEPHEN, 1983; WHISTLER, 1993b). Incluindo a aplicação industrial, no caso do gênero *Acacia*, os exsudatos são substâncias úteis para quimiotaxonomia (ANDERSON & DEA, 1969).

Após vários estudos sobre a sua composição e estrutura, (SMITH, F., 1939; ANDERSON *et al.*, 1966a; ANDERSON *et al.*, 1966b; DEFAYE & WONG, 1986; WHISTLER, 1993b), a goma arábica (*Acacia senegal*) é descrita como uma arabinogalactana ácida (pH 4,5 - 5,0), composta de arabinose (28%), galactose (39%), ácido glucurônico (17,5%), ácido 4-*O*-metil-glucurônico (1,5%) e ramnose (14%). A cadeia principal é formada por unidades de β -galactopirranose ligada (1 \rightarrow 3) com algumas ligações (1 \rightarrow 6) alternadas. As cadeias laterais apresentam de duas a cinco unidades. Essas unidades podem ser de α -L-arabinofuranose, α -L-ramnopirranose, ácido β -D-glucopirranose e ácido 4-OMe- β -D-glucopirranose. O polissacarídeo apresenta $[\alpha]_D^{25}$ de -30° , viscosidade intrínseca de 13,4 mg/L e massa molecular média em massa de $3,84 \times 10^5$. Alguns autores descrevem a goma arábica como uma arabinogalactana-proteína (AGP), apresentando cerca de 8% de proteína, a qual é rica em hidroxiprolina (MOLLARD & JOSELEAU, 1994 e referências citadas por esses autores).

1.3.1.2 *Anadenanthera colubrina*

A goma de exsudato produzida pela *Anadenanthera colubrina* (angico branco), foi estudada recentemente por DELGOBO (1993) e DELGOBO *et al.* (1998),

no Laboratório de Química de Carboidratos de Exsudatos Vegetais, no Departamento de Bioquímica (UPFR).

O polissacarídeo deste exsudato, foi analisado por técnicas como espectroscopia de RMN- ^{13}C e RMN- ^1H (uni- e bi-dimensionais), metilação e degradação controlada de Smith. Os componentes monossacarídeos deste polissacarídeo foram analisados por CG-EM. Os resultados obtidos mostraram que o polissacarídeo de angico é constituído por arabinose (64%), galactose (20%), ácido urônico (10%), ramnose (6%), manose (1%). Como verificado por RMN (mostrando a presença de 26 estruturas diferentes), este heteropolissacarídeo extremamente complexo, é formado por uma cadeia principal de β -galactopiranosose ligadas (1 \rightarrow 3), e muitas diferentes cadeias laterais, como unidades de galactopiranosose unidas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6), substituídas em O-3 por cadeias de α -L-arabinofuranose. Além disso, a cadeia principal está substituída em O-4 e O-6 por unidades de α -L-Araf, por grupos de Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcAp-(1 \rightarrow 6), por extremidades não redutoras de α -Arap ligadas em (1 \rightarrow 6) a unidades de D-Galp, além de unidades de α -Araf, β -Araf, α -Arap e β -Arap. A partir do polissacarídeo foi isolado um ácido aldobiurônico sendo identificado como 6-O- β -D-glucopiranosil-(ácido urônico)-D-galactose. Foi relatado pela primeira vez, a presença de carboidratos de baixa massa molecular de ocorrência natural em exsudato vegetal (DELGOBO *et al.*, 1994; DELGOBO *et al.*, 1998). Dentre estes, foi constatada a presença de ramnose (0,6%), arabinose (4,7%), manose (0,1%), galactose (0,8%) e alguns oligossacarídeos, contendo na sua maioria arabinose. Esses oligossacarídeos (com 0,6% de rendimento) quando analisados por cromatografia de partição em papel (CP) apresentaram 11 frações

com diferentes Rf's. Os autores (DELGOBO, 1993; DELGOBO *et al.*, 1998) demonstraram que o polissacarídeo do exsudato de *Anadenanthera colubrina*, é uma arabinogalactana ácida, como a goma arábica. e por apresentar apreciável viscosidade, tem potencial para ser utilizado industrialmente.

1.3.2 Família Combretaceae

1.3.2.1 *Anogeissus latifolia*

A goma ghatti é obtida da *Anogeissus latifolia*, árvore de grande porte abundante na Índia e Sri Lanka. Esta goma é utilizada nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacéutica, como emulsificante e estabilizante (STEPHEN, 1983; WHISTLER, 1993b).

A goma em solução (1%, p/v) apresenta um pH de 2,63, e massa equivalente de 1340 a 1735. A goma ghatti é uma mistura de componentes, sendo 90% solúvel, a heterogeneidade desta fração foi verificada por eletroforese e cromatografia em DEAE-celulose. A goma apresenta rotação específica $[\alpha]_D^{25} -50^\circ$. sendo constituída de L-arabinose (42%), D-galactose (31%), D-manose (10%), D-xilose (4,5%) e ácido D-glucurônico (11,5%), caracterizando-se como uma arabinogalactana ácida. Embora a estrutura química não esteja totalmente estabelecida, a goma apresenta uma cadeia interna formada por unidades de β -D-galactose unidas por ligação do tipo (1 \rightarrow 6), com ramificações de ácido D-glucurônico em (1 \rightarrow 4), de D-manose em (1 \rightarrow 2) e de L-arabinofuranose (STEPHEN, 1983; WHISTLER, 1993b).

1.3.3 Família Papilionaceae

1.3.3.1 *Astragalus*

A goma tragacanto é obtida a partir de várias espécies de árvores do gênero *Astragalus* (em especial *A. gummifer*), o qual ocorre em regiões áridas e montanhosas do Irã, Síria e Turquia. Esta goma é muito utilizada comercialmente, principalmente nas indústrias farmacéutica e alimentícia, por apresentar estabilidade em altas temperaturas e em meio ácido, sendo um excelente agente emulsificante e estabilizante (WHISTLER, 1993b).

A goma tragacanto consiste em dois componentes. Uma fração solúvel em água corresponde a *tragacantina*, que é uma arabinogalactana altamente ramificada neutra, composta de L-arabinose (75%), D-galactose (12%), ácido galacturônico (3%) e L-ramnose (traços). Outra fração, representa a *bassorina* ou *ácido tragacântico*, que corresponde a 60 a 70% da goma. Estruturalmente, é constituída de ácido D-galacturônico (43%), D-xilose (40%), L-fucose (10%) e D-galactose (4%), caracterizando-se como uma xilogalacturonana. Sendo que a cadeia principal é formada por unidades de ácido D-galacturônico com ligações α -(1 \rightarrow 4), ocorrendo algumas substituições em O-3 por unidades de β -D-xilopirranose, e nas extremidades terminais não redutoras unidades β -D-galactopirranose ou α -L-fucopirranose (WHISTLER & ROWELL, 1966; WHISTLER, 1993b).

1.3.4 Família Sterculiaceae

1.3.4.1 *Sterculia urens*

A goma karaia é produzida pela *Sterculia urens*, árvore de grande porte que é cultivada na Índia. Esta goma é utilizada principalmente na indústria farmacéutica, em produtos como laxante e fixadores para dentaduras. Também é utilizada na indústria de papel na produção de fibras de celulose. A karaia é a menos solúvel em água das gomas (STEPHEN, 1983; WHISTLER, 1993b).

O polissacarídeo constituinte desta goma é parcialmente acetilado (8% de grupos acetil), pH 6,0 a 8,0, apresenta uma alta massa molecular (9.5×10^6), e rotação específica $[\alpha]_D^{25^\circ} +62^\circ$. É constituído por L-ramnose, D-galactose e ácido urônicos (39,4%), caracterizando-se como uma ramnogalacturonana. A cadeia interna é formada por unidades de ácido D-galacturônico e L-ramnose, unidos por ligações do tipo (1→2) e (1→4), alternadamente, sendo que as unidades de ácido D-galacturônico apresentam substituição em O-3 por unidades de ácido D-glucurônico (STEPHEN, 1983; WHISTLER, 1993b).

1.3.5 Família Anacardiaceae

1.3.5.1 *Anacardium occidentale* L.

O *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), pertencente a Família Anacardiaceae, é uma espécie nativa do Brasil, porém, foi introduzida em muitos países tropicais e subtropicais. O cajueiro é encontrado na região litorânea do Brasil e produz um pedúnculo (pseudofruto) comestível, tido como fruto, porém, em cima deste pedúnculo é que fica o fruto verdadeiro, conhecido como “castanha de caju”. Do pseudofruto, porção carnosa, com muito suco e rica em vitamina C (261 mg/100g), além do consumo natural, são fabricados os mais variados doces e bebidas, como doce em massa, passa, caju ameixa, caju cristalizado, geléias, doces em calda, suco integral, cajuína, vinho de caju. O tecido poroso que envolve a castanha apresenta um óleo que é composto basicamente de ácido anacárdico e mais duas substâncias, o cardol (derivado do resorcinol, de longa cadeia de carbono) e cardanol (composto monovalente do fenol) (HOEHNE, 1939; FLEIG, 1989; LEPREVOST, 1998).

Com relação, ao óleo da castanha de caju tem sido usado pela indústria em todo mundo como componentes de produtos fungicidas, inseticidas, vernizes, pinturas, adesivos e até plásticos de lona para freios (MARMORI, 1994; LEPREVOST, 1998). O óleo da castanha tem sido utilizado como matéria-prima para a síntese da lasiodiplodina, a qual atua no combate da leucemia (MARMORI, 1994). A partir do ácido anacárdico, os mesmos pesquisadores, estão investigando a obtenção de um análogo do ácido salicílico. Além disso, também tem sido relatada atividade

biológica frente ao tumor de mama, do suco do fruto e do líquido da casca da castanha (KUBO *et al.*, 1993; TOYOMIZU *et al.*, 1993).

Dentro da medicina popular, existem algumas utilizações dos produtos derivados do cajueiro, como no caso do cardol, que é uma substância caústica, sendo utilizado para extirpar verrugas, manchas de pele e calos (HOEHNE, 1939; FLEIG, 1989). Além disso, a castanha de caju é utilizada aos que sofrem de memória e aos que sofrem de moléstias pulmonares e intestinais. O fruto é antissifilítico e combate inflamações. O suco é diurético, útil contra aftas, depurativo, também empregado como hemostático. A raiz é purgativa. A casca do fruto, usada em gargarejos, combate o mau hálito. A casca do tronco é antidiabética. O fruto de *A. occidentale* é recomendado para casos de edema, diabetes, debilidade dos convalescentes, vermes, etc. Além disso, outras utilizações populares do cajueiro, são a madeira usada na marcenaria e uma resina gomosa que exsuda do tronco, utilizada para encerar linha de pesca (HOEHNE, 1939).

A planta produz 0,18 a 2 kg/ano de goma, com uma média de 0,7 kg/ano (BANDEIRA, 1991). A produção de castanha em árvores mais velhas que 25 anos aumenta após a extração da goma. O estudo da goma visa potencial aplicação industrial, em função da importância da cultura do cajueiro principalmente em países, como o Brasil (400.000 a 450.000 ha de plantas; 800.000 toneladas/ano de castanha de caju) (LIMA, 1988; LEPREVOST, 1998), Índia, Moçambique, Nova Guiné, Tanzânia e Quênia.

Nos primeiros estudos, sobre a goma do cajueiro (origem brasileira) verificaram-se que após hidrólise ácida total e cromatografia de partição em

celulose do material hidrolisado, a goma era constituída por arabinose, galactose e ramnose (TIOMMO, 1946, citado por CAFFINI & PRIOLO DE LUFRANO, 1974 e 1975; ROSENTHAL, 1955).

Posteriormente, surgiram estudos da goma de cajueiro com árvores provenientes da Índia (Madras) e Nova Guiné (Papua) (BISWAS & BOSE, 1966, citado por ANDERSON *et al.*, 1974; BOSE & BISWAS, 1970; ANDERSON *et al.*, 1974; ANDERSON & BELL, 1975).

BOSE & BISWAS (1966) (citado por ANDERSON *et al.*, 1974), verificaram que na goma de cajueiro (origem indiana) não tinha a presença de nitrogênio, porém havia muita galactose, pouco conteúdo de arabinose, traços de ramnose e ácido galacturônico. Subsequentemente, os mesmos autores (BISWAS & BOSE, 1970) relataram a formação de um ácido aldobiurônico o qual foi identificado como 6-*O*- β -D-galactopiranosil (ácido urônico)-D-galactose.

De acordo com ANDERSON *et al.* (1974), a goma do cajueiro é constituída principalmente por unidades de galactose, arabinose, glucose, ácido urônico, manose e xilose. A composição varia dependendo da localização geográfica da goma, sendo verificada a proporção molar de 7:14:2:2:61:8:4,3:1,9 e 7:15:0:1:63:9:4,5:1,2, para ramnose : arabinose : xilose : manose : galactose : glucose : ácido glucurônico : 4-*O*-metilglucurônico das gomas da Índia (Madras) e Nova Guiné (Papua), respectivamente. Estes resultados demonstraram que o principal ácido urônico presente era o ácido glucurônico (em menor quantidade o seu derivado 4-*O*-metil, considerando-se a dosagem de grupos metoxil), e não o ácido galacturônico como relatado por BISWAS & BOSE (1966) e BOSE & BISWAS (1970). Outros resultados obtidos por ANDERSON *et al.* (1974) foram: $[\alpha]_D^{25^\circ}$ de

+24,2° e +23,6°; viscosidade intrínseca $[\eta]$ de 6,3 e 9.4 mL/g, [proteína] de 2,8 e 1,0 % e massa molecular média em massa ($M_w \times 10^5$) de 2,6 e 1,8, para as gomas de cajueiro, espécies indiana e papuana. respectivamente. Esses autores (ANDERSON *et al.*, 1974) demonstraram pela primeira vez a presença de glucose em um polissacarídeo de goma de exsudato.

ANDERSON & BELL (1975), examinaram a goma purificada (origem indiana) por eletroforese zonal, eletroforese em camada delgada ("Phoroslides"), cromatografia de troca-iônica e ultracentrifugação. Os resultados indicaram a presença de um sistema homogêneo. Além disso, o resultado da cromatografia por peneira molecular (em coluna de Bio-Gel A5) apresentou um primeiro pico pequeno, eluído no volume morto, possivelmente, devido a agregação molecular e um segundo largo e simétrico, que foi observado após grande volume de eluição.

ANDERSON & BELL (1975) relataram que a partir da hidrólise ácida (H_2SO_4 0,5 M, 8 horas, a 100°C) do polissacarídeo do cajueiro (origem indiana), o principal ácido aldobiurônico encontrado foi o 6-O- β -D-glucopiranosil(ácido urônico)-D-galactose, o qual apresentou uma $[\alpha]_D^{25}$ de +20° e foi caracterizado por cromatografia de partição em papel e por análise de metilação. Em quantidades menores e não suficiente para completa caracterização, outro ácido aldobiurônico apresentou uma $[\alpha]_D^{25}$ de +10° e R_f (em cromatografia de partição em papel) idêntico ao 6-O-(4-O-metil- β -D-glucopiranosil ácido urônico)-D-galactose, contrariando mais uma vez os resultados descritos por BISWAS & BOSE (1966) e BOSE & BISWAS (1970).

Esses autores (ANDERSON & BELL, 1975), utilizando a degradação

Na década de 90, surgiram outros estudos sobre a goma do cajueiro de origem brasileira (MARQUES & XAVIER-FILHO, 1990; RODRIGUES *et al.*, 1993; DE PAULA & RODRIGUES, 1995), de origem venezuelana (LÉON DE PINTO *et al.*, 1995) e de origem indiana (ZAKARIA & RAHMAN, 1996).

MARQUES & XAVIER-FILHO (1990), analisaram no exsudato de *Anacardium occidentale* (Ceará-BR) o conteúdo de carboidratos (método fenol-ácido-sulfúrico), de proteína (método de BRADFORD e KJELDAHL) e atividades de polifenoloxidase, peroxidase, quitinase, de inibidores de tripsina, quimiotripsina, subtilisina, e papaína. E concluíram que a presença da atividade de certas enzimas como as oxidases, peroxidases, fenolperoxidases, bem como de compostos como fenóis, que estão relacionados aos mecanismos de resposta da planta a certos patógenos, sugerem que a goma do cajueiro faz parte da defesa bioquímica da planta.

RODRIGUES *et al.* (1993), verificaram na goma de cajueiro, após sua hidrólise em TFA 4M, por 2,5 horas, a 100°C e posterior visualização em placas de sílica gel (solvente: álcool isopropílico:acetato de etila:água, na proporção de 7:2:1) a presença de galactose, arabinose, ramnose e glicose, não sendo detectada a presença de xilose e manose. A quantificação de ácido urônico foi de 6,3%, determinada por titulação condutométrica. A quantidade de proteína foi de 1,1 %, calculada a partir dos percentuais de nitrogênio. A viscosidade intrínseca foi em torno de 8,0 mL/g, determinada em viscosímetro capilar, na presença de NaCl 1M, a 25°C.

DE PAULA & RODRIGUES (1995), quantificaram os açúcares constituintes da goma de cajueiro por HPLC, após a hidrólise da goma isolada nas condições

descritas anteriormente (RODRIGUES *et al.* (1993). Mostraram que a goma do cajueiro (origem brasileira) apresenta 63% de galactose, 11% glucose, 5% arabinose, 4% ramnose, 1% manose e 6,3% de ácido glucurônico (por titulação condutométrica). Também relatam sobre as propriedades reológicas da goma de cajueiro (origem brasileira) e mostraram que é uma goma de baixa viscosidade e, é comparável, em muitos aspectos com a goma arábica. As viscosidades absolutas em soluções aquosas de 1% dessas gomas foram 1,0 mPas (goma de cajueiro) e 1,8 mPas (goma arábica). Outros polissacarídeos utilizados na indústria, como metilcelulose, carboximetilcelulose, gomas de karaia e de tragacanto apresentam viscosidades que variam de 1100-3400 mPas, em soluções com a mesma concentração. A análise da goma de cajueiro por cromatografia de gel permeação (GPC) mostrou um perfil de três picos, designados por A, B e C. Os autores concluíram que o pico A, único detectável por ultravioleta, seria uma fração formada por um complexo polissacarídeo-proteína (arabinogalactana-proteína), que corresponde a 6% da goma isolada. Os picos B (rendimento = 42%) e C (rendimento = 52%) correspondem ao polissacarídeo com diferentes massas molecular. A massa molecular média em massa determinada foi de 9×10^5 , $3,2 \times 10^4$, $1,6 \times 10^4$, para os picos A, B, e C respectivamente.

LÉON DE PINTO *et al.* (1995), investigaram os exsudatos de três espécies da Família Anacardiaceae (*Anacardium occidentale*, *Spondias purpurea* e *Spondias mombin*), todas de origem venezuelana. Os dados analíticos mostraram que a goma do cajueiro de origem venezuelana, apresentou uma viscosidade intrínseca menor (1 mL g^{-1}) do que a relatada para a goma de origem indiana ($6,3 \text{ mL g}^{-1}$) e

papuana ($9,4 \text{ mL g}^{-1}$) (ANDERSON & BELL, 1975). Além disso, com relação a composição monossacarídica, foram relatadas diferentes proporções de galactose:arabinose, sendo de 4:3 para a de origem venezuelana e de 6:1 para a de origem indiana e papuana. Os exsudatos das três espécies, acima citadas, foram avaliados por espectroscopia de RMN- ^{13}C , sendo atribuídos apenas os assinalamentos para β -D-galactose e ácidos urônicos.

ZAKARIA & RAHMAN (1996), investigaram as propriedades de solubilidade e reológicas da goma de cajueiro (origem indiana). Uma fração correspondente a cerca de 64,2% da goma foi obtida por dissolução em água, a 30°C . Outra fração (13,4%) foi obtida após o aquecimento da suspensão. A fração obtida a 30°C apresentou uma viscosidade maior tanto em relação a fração extraída após o aquecimento, como em relação a goma bruta.

1.3.5.2 *Lannea humilis* (Oliv.) Engler

ANDERSON & HENDRIE (1972), verificaram que o polissacarídeo (80%) obtido do exsudato produzido pela *Lannea humilis*, apresenta D-galactose (75%), L-arabinose (11%), L-ramnose (2%), e ácidos urônicos (D-GalpA > D-GlcpA ~ 4-O-Me-D-GlcpA) (12%), caracterizando-se como uma arabinogalactana ácida. Foram obtidos e caracterizados por cromatografia de partição em papel três ácidos aldobiurônicos, (1) ácido 4-O-(α -D-galactopiranosilurônico)-D-galactose, (2) ácido 6-O-(β -D-glucopiranosilurônico)-D-galactose, e (3) ácido 6-O-(4-O-metil-D-glucopiranosilurônico)-D-galactose. A massa molecular média em massa calculada para esta molécula foi de $2,57 \times 10^5$ e a $[\alpha]_D^{25^\circ}$ foi de $+43^\circ$. Os autores,

utilizando a degradação controlada de Smith e a análise de metilação para a determinação da estrutura química deste polissacarídeo, concluíram que este é uma estrutura altamente ramificada, e apresenta uma cadeia principal formada por unidades de β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 3) ligadas, frequentemente com substituições em O-6, por unidades isoladas de D-galactose ou cadeias curtas de D-galactose. As unidades de arabinose participam como terminais não redutores ou em curtas cadeias (~4 unidades). Os autores sugerem também ligações de D-galactose β -(1 \rightarrow 6) ligadas na cadeia principal. Os três ácidos aldobiurônicos caracterizados e a pequena proporção de ramnose estão presentes como unidades terminais não redutoras, porém não foi estabelecido o modo de ligação das unidades de ramnose.

1.3.5.3 *Lannea coromandelica*

ANDERSON & HENDRIE (1973), verificaram que a árvore *Lannea coromandelica* exsuda um polissacarídeo (78%), o qual é solúvel em água, sendo formado por D-galactose (70%), L-arabinose (11%), L-ramnose (2%), e ácidos urônicos (D-GalpA, D-GlcpA e 4-O-Me-D-GlcpA) (17%), caracterizando-se como uma arabinogalactana ácida. A massa molecular ponderal média em massa calculada para esta molécula foi de $2,57 \times 10^5$ e a $[\alpha]_D^{25}$ foi de $+27^\circ$. Os autores, utilizando a degradação controlada de Smith e a análise de metilação para a determinação da estrutura química deste polissacarídeo, concluíram que este é uma estrutura altamente ramificada, e apresenta uma cadeia principal formada por unidades de β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 3) ligadas, sendo ramificada e

intercalada com ligações β -(1 \rightarrow 6). Nas posições 3 e 6, apresentaria como extremidades não redutoras unidades únicas de D-galactose ou cadeias curtas de D-galactose, ou unidades de L-arabinose. Além, da presença dos três ácidos alcobiurônicos: (1) ácido 4-O-(α -D-galactopiranosilurônico)-D-galactose, (2) ácido 6-C-(β -D-glucopiranosilurônico)-D-galactose, e (3) ácido 6-O-(4-O-metil-D-glucopiranosilurônico)-D-galactose. A estrutura deste polissacarídeo é similar ao relatado anteriormente para a goma de *Lannea humilis* (ANDERSON & HENDRIE; 1972).

1.3.5.4 *Spondias dulcis*

BASU (1980), realizou alguns estudos estruturais com o exsudato obtido de uma planta indiana *Spondias dulcis*. A partir de uma solução aquosa da goma e posterior precipitação com etanol, o polissacarídeo obtido (90%) apresentou homogeneidade verificada por eletroforese de alta voltagem e análises por ultracentrifugação e uma $[\alpha]_D^{26^\circ}$ de -4° . A composição monossacarídica desta molécula correspondeu a galactose (19,8%), arabinose (48,5%) e ácido galacturônico (20%), caracterizando-se como uma arabinogalactana ácida. O polissacarídeo nativo foi submetido a autohidrólise (60 horas, a 100°C), obtendo-se a goma degradada. Esta molécula, com $[\alpha]_D^{26^\circ}$ -14° , apresentou a proporção molar de 3:3:1, para galactose, arabinose e ácido galacturônico, respectivamente. A goma degradada carboxi-reduzida como apresentou uma proporção molar de 1,3:1 de galactose:arabinose, confirmou-se a presença do ácido galacturônico. Após a análise de metilação da goma ácido-degradada, os autores concluíram

que este polissacarídeo apresenta a cadeia principal formada por unidades de galactopiranosose (1→3) ligadas e unidades de ácido galacturônico. As ramificações contêm unidades de arabinose ligadas em O-6 e em O-2 aos resíduos de galactopiranosose. As extremidades não-redutoras seriam formadas por unidades de Araf e Arap.

1.3.5.5 *Spondias pinnata*

O exsudato produzido por esta planta que apresenta interesse medicinal, foi estudado por GHOSAL & THAKUR (1981). O polissacarídeo ácido purificado após precipitação da goma com etanol:acetona (9:1) e posterior cromatografia de troca-iônica em DEAE-cellulose do precipitado obtido, mostrou-se constituído por D-galactose (47%), L-arabinose (27%), e ácido D-galacturônico (30%), caracterizando-se como uma arabinogalactana ácida. A homogeneidade deste polissacarídeo, com $[\alpha]_D^{24^\circ} -38^\circ$, foi verificada por filtração em gel permeação e eletroforese de alta voltagem. A análise de metilação e a degradação controlada de Smith mostraram que a cadeia principal é formada por uma D-galactana ligada (1→3). A presença do ácido D-galacturônico foi comprovada pelos dados de metilação, verificando a presença dos derivados 2,3,4-Me₃-Gal (5% e 3%) e 2,3-Me₂-Gal (4% e 4%) após a redução da carboxila com hidreto de lítio alumínio, nos polissacarídeos nativo e parcialmente hidrolisado, respectivamente. O derivado 2,3- estaria envolvido nas ligações (1→4), e o 2,3,4- funcionaria como extremidades não redutoras.

1.3.5.6 *Spondias purpurea*

PEREZ *et al.* (1995) realizaram estudos sobre a composição monossacarídica do exsudato de *Spondias purpurea*. O polissacarídeo é constituído por β -galactose (61%), L-arabinose (17%) e ácido galacturônico (22%). Além disso, ácido aspártico e valina foram os principais aminoácidos constituintes encontrados na goma, sendo que esta apresentou baixo conteúdo de hidroxiprolina.

LÉON DE PINTO *et al.* (1996) realizaram estudos sobre a caracterização estrutural do polissacarídeo isolado da goma vegetal de *Spondias purpurea*. O polissacarídeo apresenta-se constituído por galactose (59%), arabinose (9%), manose (2%), xilose (2%), ramnose (2%) e ácidos urônicos (26%), caracterizando-se como uma arabinogalactana ácida. Utilizando a RMN-¹³C e análise de metilação, os autores concluíram que este polissacarídeo é constituído por uma cadeia principal formada por unidades de galactopirranose unidas por ligação do tipo β -(1 \rightarrow 3), a qual apresenta unidades de galactose O-6 substituídas. Existem na estrutura, cadeias laterais de arabinofuranose, de mais de 2 unidades, ligadas entre si por α -(1 \rightarrow 3). Enquanto, que as unidades de manose, xilose, ramnose e ácido urônico (ácido glucurônico e 4-O-metil glucurônico) ocorrem, predominantemente, nas extremidades terminais não redutoras do polissacarídeo.

1.4 OLIGOSSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS VEGETAIS, DERIVADOS E NATURAIS

Dos componentes glicídicos, os polissacarídeos são, sem dúvida, os principais constituintes oriundos de exsudatos de árvores. Entretanto, tem-se estudos sobre a presença e caracterização estrutural de oligossacarídeos livres redutores, enquanto constituintes minoritários (DELGOBO *et al.*, 1994).

Os oligossacarídeos podem ocorrer livres na natureza (oligossacarídeos livres redutores e não redutores) ou obtidos por hidrólise química ou enzimática a partir de forma poliméricas ou sintetizados química ou enzimaticamente *in vitro* (STANEK *et al.*, 1965).

Como grande parte dos oligossacarídeos de exsudatos descritos na literatura foram obtidos por hidrólise parcial (ácida ou enzimática) a partir do polissacarídeo, o estudo sobre oligossacarídeos naturais torna-se interessante. Além disso, a caracterização estrutural dos oligossacarídeos naturais, bem como, dos obtidos por hidrólise, é de grande importância uma vez que pode contribuir para a elucidação da estrutura das moléculas de origem (STANEK *et al.*, 1965).

A hidrólise ácida total de gomas de exsudatos produz unidades monossacarídicas e ácidos aldobiurônicos resistente a ácido. WHISTLER & ROWELL (1966) relataram alguns ácidos aldobiurônicos produzidos, sendo o mais comum o ácido 6-O- β -D-glucopiranosil(ácido urônico)-D-galactose, o qual foi isolado primeiramente a partir da goma arábica (*Acacia vereck*). Porém, já foi obtido das gomas *Acacia mollissima*, *Acacia karroo*, *Acacia cyanophylla*, *Acacia pycnantha*, *Anogeissus latifolia*, *Prunus domestica*. O ácido 2-O-D-glucopiranosil(ácido

urônico)-D-manose foi obtido das gomas de *Prunus insitia*, *Prunus virginiana*, *Acogeissus latifolia*, e *Hakea acicularis*. O ácido 4-O-(D-glucopiranosil)-D-galactose foi isolado dos exsudatos vegetais de *Citrus maxima*, *Acacia karroo* e *Citrus limonia*. O ácido 6-O-[4-O-metil-D-glucopiranosil (ácido urônico)]-D-galactose foi obtido das gomas de *Prosopis juliflora* e *Khaya grandifolia*. Outros ácidos aldobiurônicos com ligação (1→6) foram obtidos da goma de *Prosopis juliflora*.

1.4.1 Oligossacarídeos vegetais primários e secundários

De acordo com KANDLER & HOFF (1980), os oligossacarídeos de plantas são divididos em: oligossacarídeos primários e secundários. Os oligossacarídeos primários compreende os que são sintetizados *in vivo* a partir de monossacarídeos ou oligossacarídeos e de um doador glicídico pela ação de glicosiltransferases. Essas moléculas ocorrem em quantidades consideráveis em plantas e apresentam função metabólica relevante, como por exemplo, estoque de energia, resistência a frio, translocação. A sacarose é o mais comum e mais importante oligossacarídeo primário de plantas. Nos oligossacarídeos secundários, incluem-se aqueles que são obtidos por hidrólise de polissacarídeos e outros glicoconjugados *in vivo* ou *in vitro*. Quando ocorrem em plantas, é devido a hidrólise *in vivo*, não sendo acumulados.

Muitos estudos, mostram que oligossacarídeos (tipo secundário), podem atuar como moléculas sinalizadoras em múltiplos sistemas vegetais, por exemplo, nos mecanismo de defesa da planta e em processos de desenvolvimento vegetal,

como morfogênese, produção de etileno, inibição do alongamento induzido por auxina etc (RYAN & FARMER, 1991; DINAND *et al.*, 1997; VARGAS-RECHIA, 1998).

1.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS

A determinação da estrutura química de polissacarídeos e de oligossacarídeos pode ser feita por métodos químicos e físicos. A partir de métodos químicos clássicos como as análises de metilação (GEYER & GEYER, 1994), podendo-se determinar a estrutura dos poli- e oligossacarídeos, quando em conjugação com CG-EM. A cromatografia líquida gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG-EM) (MCNEIL *et al.*, 1982; MERKLE & POPPE, 1994) pode dar informações sobre a composição monossacarídica e estrutura individual destas unidades. Pode-se determinar as massas moleculares destas moléculas utilizando espectrometria de massa acoplada ao rápido bombardeamento atômico (FAB-MS) (DELL *et al.*, 1994) ou “electrospray-ionisation mass spectrometry” (ESI-MS) (EDMONDS & SMITH, R.D., 1990; READ *et al.*, 1996). Informações estruturais como o número de resíduos de açúcares, configuração anomérica, sequência e posição dos grupos substituintes podem ser obtidas utilizando as técnicas de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (unidimensional), e correlações homo e heteronucleares (bidimensional) como, COSY (Correlation NMR Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation NMR Spectroscopy), ROESY (Rotating-frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple-Quantum

Coherence Spectroscopy) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy) (DABROWSKI, 1989; AGRAWAL, 1992; VAN HALBEEK, 1994; JONES, C., 1994). As correlações dos tipos COSY e TOCSY permitem obter os assinalamentos dos prótons. Os experimentos tipo HMQC, que correlacionam os deslocamentos químicos dos carbonos com os dos prótons diretamente relacionados, complementam as informações obtidas pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H . Os experimentos dos tipos ROESY, NOESY e HMBC são úteis na determinação das posições das ligações glicosídicas, sendo utilizados ROESY e HMBC para oligossacarídeos e NOESY para polissacarídeos.

Na Tabela II estão sumarizadas as informações estruturais obtidas pelos experimentos de RMN.

Tabela II: Informações estruturais e métodos de RMN

INFORMAÇÃO ESTRUTURAL	MÉTODOS DE RMN
1. Número de resíduos de açúcares	a. Espectro RMN- ^1H b. Espectro RMN- ^{13}C c. Espectroscopia de correlação HMQC [^1H - ^{13}C]
2. Configuração anomérica	a. Deslocamentos químicos RMN- ^1H b. Deslocamentos químicos RMN- ^{13}C c. Constantes de acoplamento (J) de H-1/H-2 e C-1/H-1
3. Sequência e tipos de ligação	a. Espectroscopia de correlação, como, HMBC, ROESY e NOESY
4. Substituintes não-glicídicos	a. Deslocamentos químicos RMN- ^1H e ^{13}C b. Espectros de outros núcleos, como ^{31}P e ^{15}N

1.6 ALGUNS ASPECTOS SOBRE BIOSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS VEGETAIS

Existem poucas informações na literatura sobre metabolismo de exsudatos de plantas. É provável que a síntese destes polímeros e de outros heteropolissacarídeos envolvem a participação do nucleotídeo açúcar. Estes polissacarídeos contêm mais de um tipo de monossacarídeo, e alguns também podem conter componentes não glicídicos. A especificidade das enzimas biossintéticas é diferente de acordo com tipo de monossacarídeo requerido para a formação do polissacarídeo. É necessário esclarecer a questão de como ocorre a interação e a regulação destas diferentes enzimas para produção de um produto com uma estrutura precisa ou se não ocorre esta regulação produzindo moléculas com graus de randomização diferentes (BRETT & WALDRON, 1990).

Em muitos casos, os monossacarídeos individuais são convertidos aos seus nucleotídeos açúcares derivados, e então este intermediário de alta energia é utilizado nas reações de polimerização. As enzimas que catalisam a formação dos açúcares ativados são chamadas de pirofosforilases ou nucleotíditransferases. Além disso, existem outras enzimas (epimerases, quinases e descarboxilases) que participam na produção e interconversão de uma grande variedade de nucleotídeos açúcares (SMITH, C.J., 1993). A UDP-glucose é um nucleotídeo açúcar que ocupa uma posição central do metabolismo dos açúcares nucleotídeos. Sendo utilizada tanto como precursor para síntese de sacarose como na formação de outros açúcares nucleotídeos que são necessários na formação dos componentes da parede celular e de outros

polissacarídeos não celulósicos (JAMES *et al.*, 1985; SMITH, C.J., 1993).

Os açúcares nucleotídeos-difosfato são usados como doador de unidades de açúcares, e em muitos casos há o envolvimento de derivados UDP. Os açúcares nucleotídeos são produzidos por reações associadas das vias oxidativas de açúcares nucleotídeos e do *mio*-inositol. Existem evidências, que na fase de iniciação da síntese ocorre adição de uma unidade de açúcar nucleotídeo à cadeia do polissacarídeo em formação. Em alguns casos podendo ter a participação de um iniciador agliconado (proteína), como no caso da glucuroxilana de ervilha e de xiloglucana de suspensão de células de feijão, ou ocorrer a presença de um intermediário lipídico (BRETT & WALDRON, 1990). Na fase de alongamento da cadeia polissacarídica, ocorre pela adição de mono ou oligossacarídeos na extremidade não redutora da molécula. A fase de finalização da cadeia polissacarídica, os mecanismos envolvidos não estão totalmente esclarecidos, em virtude da grande polidispersidade destas macromoléculas (FINCHER & STONE, 1981).

Experimentos com açúcares marcados mostraram que a síntese de polissacarídeos da matriz ocorre dentro do retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, e não na parede celular. Porém, não está esclarecido se dentro das vesículas do complexo de Golgi ocorre um único tipo de polissacarídeo ou se existe uma variedade dos polissacarídeos da matriz. A formação dos polissacarídeos ocorre através da atividade de glicosiltransferases (polissacarídeo-sintases), enzimas que catalisam a transferência do resíduo de açúcar de uma molécula a outra. Uma variedade de enzimas com atividade de polissacarídeo-sintases tem sido identificadas, as quais estão envolvidas na

síntese de arabinanas, galacturonanas, glucomananas, glucanas, xilanas e galactosanas. Há pouco conhecimento detalhado sobre as reações catalisadas por estas enzimas. A síntese *in vitro* é aumentada após adição de um “primer”, um oligossacarídeo ou polissacarídeo para onde os açúcares nucleotídeos são transferidos. Não está esclarecido se *in vivo* há o requerimento de um “primer” glicídico ou protéico para a síntese. Outros problemas a serem considerados com relação à síntese de polissacarídeos ocorre no fato de que na síntese destes polímeros não há o envolvimento de um molde molecular como no caso da síntese de proteínas. Deste modo, surgem dúvidas sobre quais seriam os sinais intracelulares para o início e/ou término da síntese do polissacarídeo. O tamanho final do polissacarídeo dependerá de uma série de fatores como a atividade das enzimas envolvidas no processo de síntese, a disponibilidade de substratos e o tempo que leva para que ocorra a formação da molécula dentro do sistema de endomembrana. Além disso, em especial para os heteropolissacarídeos, existem dúvidas de como ocorre a atuação das várias enzimas glicosiltransferases envolvidas na formação do polímero, uma vez estas irão formar estruturas bem precisas (SMITH, C.J., 1993).

1.6.1 Estudos relacionados com biossíntese de polissacarídeos de exsudatos vegetais

MAIR *et al.* (1983) realizaram estudo ultraestrutural dos ductos de gumíferos de cajueiro (*A. occidentale*), sendo que os resultados estão descritos a seguir.

→ goma de cajueiro é produzida por ductos especializados do caule de *A.*

occidentale. Os ductos gumíferos no floema primário do caule apresentam desenvolvimento esquisogênico. As células epiteliais localizadas nas bordas do ducto são ovais e apresentam uma parede interna fina, sem plasmodesmata. O citoplasma das células epiteliais são ricos em retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres, polissomos, mitocôndrias com cristas aumentadas, plastídeos com inclusões eletro-densas, dictiossomas com vesículas e vacúolos com material eletro-denso. Material eletro-denso tem sido observado nas dilatações das cisternas dos dictiossomas e também nas vesículas. Algumas vezes, este material agrega-se e forma grandes glóbulos ligados à membrana. Os glóbulos se fundem com a plasmalena na parte interna da parede e o conteúdo é depositado no espaço entre o protoplasto e a parede. Este material passa através da matriz da parede para o ducto. As células que estariam na fase ativa de secreção do ducto, seriam aquelas que apresentariam um grande número de dictiossomas e vesículas. Em ductos maduros foram observadas poucas células epiteliais que apresentam, características de autólise, como, conteúdo eletro-denso, organelas degradadas, alto grau de vacuolização, parede celular interna com sinais de desintegração, levando a liberação do conteúdo celular.

Na Figura 02 está esquematizado o local de síntese de material gomoso e seu transporte através da membrana.

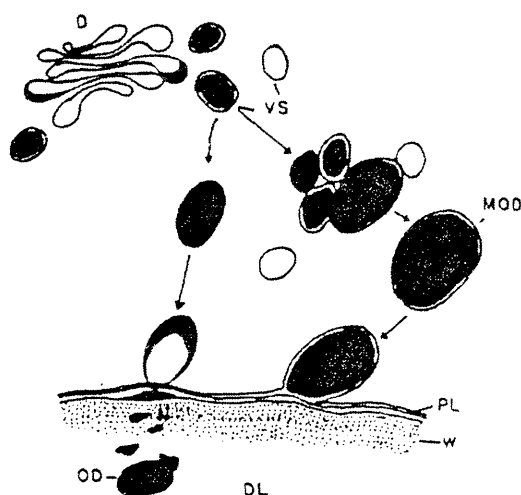


Figura 02: Diagrama esquematizado do possível local de síntese de material gomoso e seu transporte através da membrana.

* Fonte: NAIR *et al.* (1983). Abreviaturas: D- dictiossomos; DL- lúmen do ducto; MOD- material eletro-denso ligado à membrana; OD- material eletro-denso; PL: plasmalema; VS- vesícula; W- parede celular.

Em estudos com *Acacia senegal* (JOSELEAU & ULLMANN, 1990), foi verificado que o local de formação das gomas ocorre na região cambial, ou precisamente entre a região cambial e a região da casca interna. Nesses estudos comparou-se a composição monossacarídica dos polissacarídeos produzidos na região da casca interna, na região cambial e nas zonas do xilema de um galho produtor de goma, com a composição da goma arábica. Somente os polissacarídeos da região da casca interna e da cambial apresentaram composição semelhante à goma arábica. Estudos de análise de metilação e de espectroscopia de RMN-¹³C do polissacarídeo da região cambial confirmaram os dados obtidos com relação a composição, levando a conclusão que na região cambial encontra-se o precursor da goma. Porém, existem dúvidas quanto à

formação definitiva do polímero, ou seja, se o polímero é sintetizado por completo no próprio nódulo onde é exsudado, ou se sai pronto do próprio câmbio.

Estudos sobre células de cultura de *Acacia senegal* (realizado por MUSTACHE *et al.*, 1986, citado por MOLLARD & JOSELEAU, 1994) mostraram a presença de arabinogalactanas-proteínas (AGPs) secretadas no meio de cultura de suspensão de células de *A. senegal*.

As AGPs são proteoglicanas ricas em carboidratos (> 90%), a qual contém alta proporção de unidades de D-galactopiranosose e L-arabinofuranose, mas podem conter pequena e variável proporção de outros monossacarídeos neutros e ácidos. A porção glicídica das AGPs compreende uma cadeia principal de unidades de galactopiranosose unidas por ligações do tipo O-3, O-6 e O-3,6, as quais estão substituídas por unidades de L-arabinofuranose, podendo apresentar outros monossacarídeo menos abundantes, como α -L-Arap, α -L-Rhap, β -D-Glcp e β -D-GlcpA, como extremidades terminais não redutoras. A porção proteica das AGPs (2 a 10%) é tipicamente rica em hidroxiprolina, serina, alanina, treonina e glicina. Essas moléculas são encontradas, principalmente, no espaço extracelular de tecidos vegetais (FINCHER *et al.*, 1983).

Considerando-se que existem características comuns entre estas AGPs e a goma arábica e também para verificar se estas células apresentavam ainda a habilidade de secretar a goma arábica, *in vitro*, MOLLARD & JOSELEAU (1994) caracterizaram uma fração purificada a partir do meio de cultura de suspensão de células de *A. senegal*. Esses autores realizaram um estudo comparativo do ponto de vista estrutural entre esta fração secretada no meio de cultura e a goma arábica exsudada pela *A. senegal*. Foram utilizados parâmetros como, a

composição de carboidratos e aminoácidos. A partir da suspensão de células de *A. senegal* (com 50 dias), foi realizado o isolamento de polissacarídeos extracelulares, por fracionamento com DEAE-celulose, obtendo-se a fração F5, a qual foi eluída com NaOH 2M. A composição monossacarídica de F5 consistiu de arabinose e galactose, como monossacarídeos majoritários, além de ramnose, ácido glucurônico e 4-*O*-metil glucurônico. A estrutura química apresentou uma cadeia principal de unidades de β -galactapirranose (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) ligada, com unidades de α -arabinofuranose em extremidades não redutoras e em cadeias laterais *O*-5 substituídas. As unidades de ácido glucurônico estariam substituídas em *O*-4 por unidades de seu derivado éter ou por unidades terminais de α -L-ramnose. O presente estudo mostrou que o polissacarídeo extracelular F5 consiste de uma arabinogalactana-proteína altamente ramificada, sendo que a estrutura da porção glicídica desta fração é muito similar a da estrutura da goma arábica. Ambos polissacarídeos, são caracterizados por várias cadeias laterais com unidades terminais não redutoras de α -L-ramnose e α -L-arabinose e com sequência terminal de ramnose- α -(1 \rightarrow 4)-ácido glucurônico. Algumas diferenças encontradas na fração F5, foram que esta apresentou maior percentagem de unidades de arabinose ligadas em (1 \rightarrow 5) e menor conteúdo de arabinose ligadas por (1 \rightarrow 3), em relação, a goma arábica.

Em relação, a composição de aminoácidos, demonstra-se claramente que a fração F5 secretada difere da goma exsudada pela árvore de *A. senegal*. Este apresentou um conteúdo proteico de 11%, caracterizando-se como uma glicoproteína, sendo que a composição de aminoácidos mostrou um conteúdo pobre em hidroxiprolina, diferente do encontrado para goma arábica em que o

conteúdo de hidroxiprolina é alto. Os autores relatam que a fração F5 é uma AGP deficiente em hidroxiprolina, o que também foi encontrado em outros meios de suspensão de células. Além disso, existem evidências que o acúmulo de AGPs no meio de cultura seja em resposta à injúria ou estresse. Tem-se atribuído as AGPs outras funções como regulação do desenvolvimento, manutenção da umidade, adesão e nutrição (FINCHER *et al.*, 1983). Recentemente, tem-se relatado também que as AGPs estão relacionadas ao crescimento e desenvolvimento vegetal (GANE *et al.*, 1995) e no controle de embriogênese somática (KREUGER & VAN HOLST, 1993).

Embora este complexo arabinogalactana-proteína apresente características similares à goma arábica, em especial a porção glicídica, não é possível concluir se as células de *Acacia senegal* cultivadas em suspensão permanecem com a habilidade de exsudar a verdadeira goma (MOLLARD & JOSELEAU, 1994). Esses autores comentam que posteriores estudos sobre padronização das condições de cultura e de enzimas envolvidas na biossíntese da AGP - hidroxiprolina deficiente, poderiam contribuir na elucidação do papel e função destas glicoproteínas e da biossíntese da goma arábica.

1.7 JUSTIFICATIVAS

Considera-se, importante e necessária, a caracterização da estrutura química dos polissacarídeos de exsudatos vegetais, com a finalidade de uma futura aplicação tecnológica e/ou biológica destas moléculas.

O estudo sobre oligossacarídeos naturais de exsudatos é interessante, em virtude de que os oligossacarídeos de gomas vegetais descritos na literatura foram obtidos por hidrólise parcial (enzimática ou química). Além disso, a caracterização dos oligossacarídeos (naturais ou obtidos por hidrólise), pode contribuir na elucidação da estrutura dos polissacarídeos.

A origem dos oligossacarídeos, de ocorrência natural, nas gomas vegetais é incerta. Pode-se supor, que seriam produtos de autohidrólise, enzimólise ou de biossíntese da goma vegetal. A elucidação sobre a natureza dessas moléculas poderia contribuir para o entendimento do mecanismo de biossíntese de exsudatos em plantas superiores.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho, tem como objetivo a determinação da estrutura química do polissacarídeo do exsudato de *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), de origem brasileira (Caruaru - PE) e a análise estrutural comparativa entre os oligossacarídeos naturais e os obtidos por hidrólise ácida parcial.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

1. Quantificação dos monossacarídeos redutores presentes no exsudato vegetal de *Anacardium occidentale*.
2. Obtenção, purificação e caracterização estrutural, por métodos espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H , dos oligossacarídeos naturais.
3. Obtenção e caracterização estrutural do polissacarídeo presente no exsudato vegetal de *Anacardium occidentale*, por análise de metilação e métodos espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H , além da determinação da composição monossacarídica por CG-EM.
4. Caracterização estrutural dos polissacarídeos resultantes da hidrólise ácida parcial e da degradação controlada de Smith.
5. Obtenção, purificação e caracterização estrutural, dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAS E REAGENTES

Açúcares padrões (ácidos glucurônico e galacturônico - forma Na, arabinose, galactose, glucose, lactose, ramnose e outros) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Papel para cromatografia nº 1 (análises qualitativas e semi-quantitativas) e nº 3 (análises preparativas) e celulose (CF II) foram obtidos da Whatman.

Placas de cromatografia em camada delgada (TLC) de celulose, reagentes utilizados na composição dos solventes para cromatografias (*n*-butanol, piridina, etanol, ácido acético, acetona, acetato de etila) e reveladores para cromatografias como o nitrato de prata e cloridrato de *p*-anisidina, além da água deuterada foram provenientes da Merck A.G. Darmstadt (Darmstadt, Alemanha).

Os outros solutos e solventes químicos utilizados foram de grau reagente-analítico, como especificado pelo fabricante.

3.2 EXSUDATO VEGETAL EM ESTUDO

A goma vegetal de *Anacardium occidentale* L. (cajeeiro) (Figura 03) utilizada como objeto de estudo neste trabalho, foi coletada no período sazonal de dezembro a março, no município de Caruaru (PE), gentilmente pela Profa. Dra. Helena Simões Duarte (UFPE-Rural).

A goma coletada foi submetida a uma limpeza manual, para retirar partes de tronco, cascas, folhas e outros eventuais contaminantes. A goma limpa foi

conservada em freezer a -18°C .

O teor de umidade da goma vegetal determinado foi de 15% (valor médio de 4 amostras) (SMITH R.J., 1964). As determinações foram feitas utilizando amostras de 50,0 g, mantidas a 100°C , até peso constante (24, 48 horas).

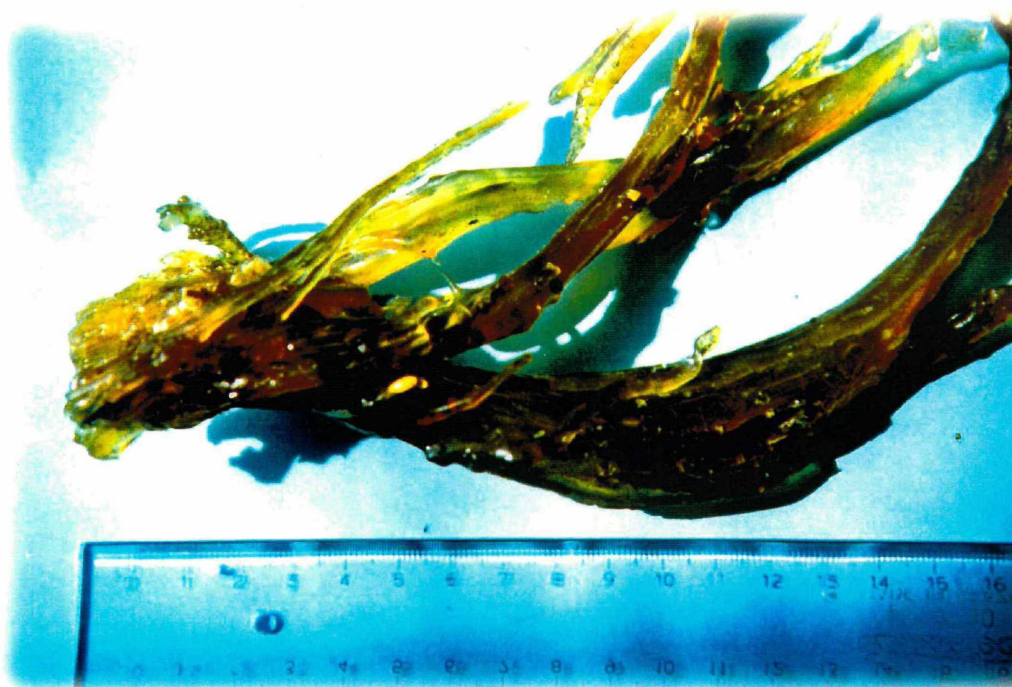


Figura 03: Exsudato vegetal obtido de *Anacardium occidentale* L. (cajueiro).

3.3 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS LIVRES PRESENTES NO EXSUDATO VEGETAL DE *Anacardium occidentale*

A goma do cajueiro (504 mg) em água destilada (20 mL) foi solubilizada na presença de alitol (padrão interno) (5 mg) e NaBH_4 (50 mg), sob agitação. A ação do agente redutor foi visualizada pela formação de bolhas na solução. Após 16 horas, foi adicionado mais 20 mg do agente redutor. Seguidamente, após 3 horas a solução foi neutralizada (pH 7,0), com adição de ácido acético. A solução foi solubilizada, redissolvida em 5 mL de água destilada e adicionou-se 15 mL de etanol. O precipitado de polissacarídeo foi removido por filtração e o sobrenadante foi concentrado por pressão reduzida. Posteriormente, o resíduo obtido do sobrenadante foi lavado com metanol, o qual foi levado em evaporador rotatório. Este processo foi repetido mais duas vezes. O resíduo lavado foi acetilado, com uma mistura de anidrido acético:piridina (2 mL, 1:1, v/v), a 100°C, por 1 hora. Os alditóis acetatos foram extraídos com clorofórmio, o qual foi evaporado até à secura. O excesso de piridina foi eliminado com solução aquosa de sulfato de cobre 2% (p/v). Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG-EM), de acordo como está descrito no item nº 3.11 sobre MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

Em outro experimento, a goma de cajueiro (500 mg) em água destilada (20 mL) e na presença de alitol (5 mg) foi dissolvida, antes da adição do agente redutor (NaBH_4 - 50 mg). Após 16 horas, o agente redutor foi adicionado.

Posteriormente, 3 horas após a solução foi neutralizada, e os alditóis obtidos foram acetilados, como no experimento anterior. Os alditóis acetatos foram analisados por CG-EM.

3.4 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS LIVRES DO EXSUDATO VEGETAL DE *Anacardium occidentale*

O sobrenadante obtido da precipitação etanólica foi utilizado para o isolamento dos oligossacarídeos livres. O sobrenadante foi concentrado e liofilizado, obtendo-se um rendimento de 0,87% com relação a goma bruta.

O sobrenadante foi redissolvido em água destilada e passado em resina catiônica por 20 min. Posteriormente, foi submetido a cromatografia de adsorção através de um filtro de carvão-Celite (terra de infusórios - Reagen), na proporção (1:1, p/p) (40 g) (WHISTLER & BEMILLER, 1962a; LEMIEUX, 1962). A eluição foi feita com um gradiente descontínuo de água destilada (4 L) (Fração A), etanol aquoso 30% (2 L) (Fração E30%) e 50% (2 L) (Fração E50%).

A Fração A foi fracionada em cromatografia de partição em papel (CP) Whatman nº 3, utilizando o sistema de solvente *n*-butanol:piridina:água (1:1:1, v/v) (solvente nº 2), como está descrito no item nº 3.11 sobre MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

As Frações E30% e E50% obtidas foram cromatografadas em coluna de celulose (5,5 cm de diâmetro x 40 cm de altura) (WHISTLER & BEMILLER, 1962b) e eluídas em gradiente descontínuo com solventes de acetona:água destilada, nas proporções (v/v), 7:1 (1 L), 4:1 (1 L), 3:1 (2 L), e 5:2 (2 L), respectivamente.

As frações coletadas da coluna de celulose foram concentradas em rotaevaporador, e cromatografadas em papel (Whatman nº 3; solvente nº 2) para purificação total das amostras.

O grau de pureza das amostras foi monitorado por CP ou em cromatografia de partição em camada delgada (celulose) (TLC - celulose) (HOUGH & JONES, 1962).

Em cada etapa de purificação foram calculados os rendimentos das amostras.

3.5 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO NATIVO (PN) DO EXSUDATO VEGETAL DE *Anacardium occidentale*

A goma bruta (250 g) foi dissolvida em água destilada (1250 mL), sob agitação, em temperatura ambiente. O polissacarídeo foi isolado por precipitação com etanol em excesso (3 L). Após filtração a vácuo, o precipitado obtido foi redissolvido em água destilada, dialisado e então liofilizado para remoção do etanol residual (DELGOBO, 1993, com modificações). Obteve-se um rendimento de 80% de polissacarídeo com relação à goma bruta. O procedimento está mostrado na Figura 04.

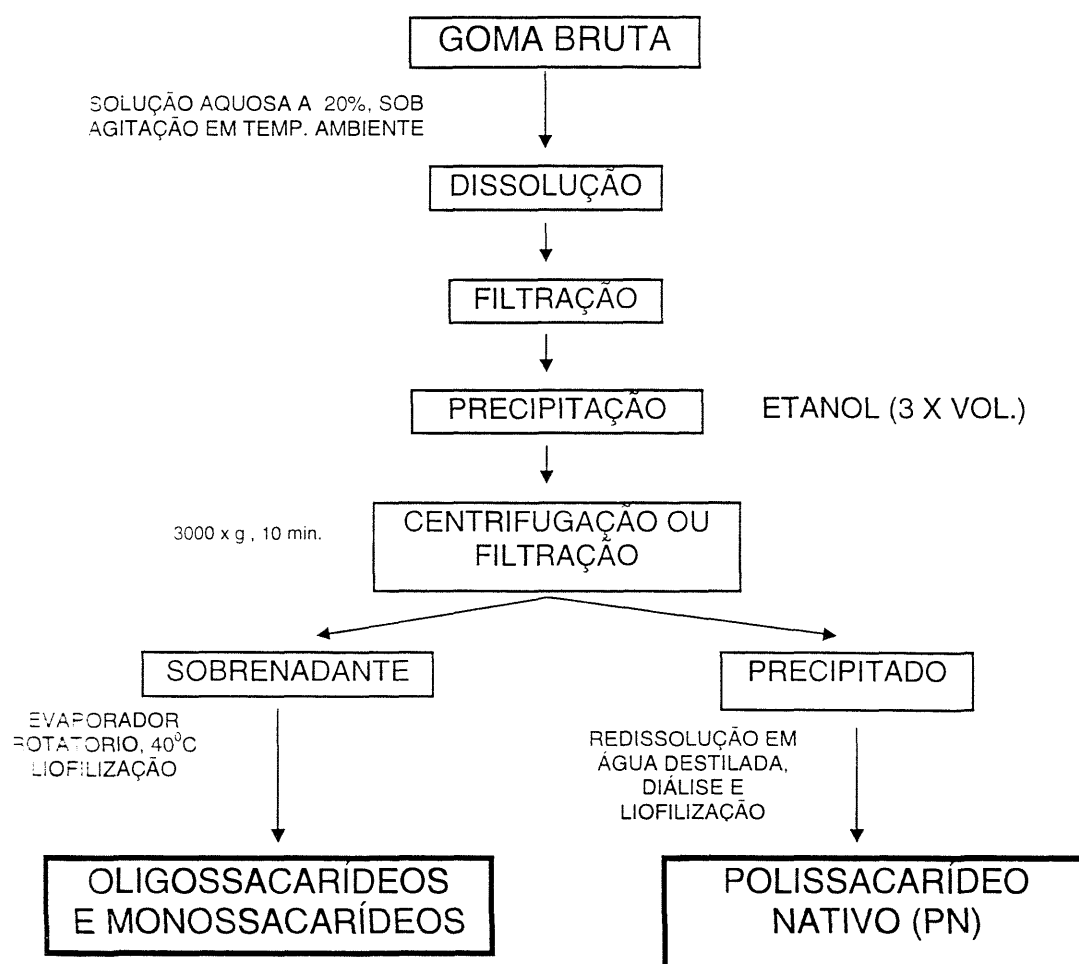


Figura 04: Esquema de obtenção dos carboidratos presentes no exsudato vegetal de *Anacardium occidentale*

3.6 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO (PN) DO EXSUDATO VEGETAL DE *Anacardium occidentale*

O polissacarídeo (PN) (5,34 g) foi solubilizado em água destilada (200 mL), e o pH da solução foi ajustado para 1,0 pela adição de solução aquosa de H_2SO_4 . O polissacarídeo foi mantido a 100°C , por 5 horas. A solução foi neutralizada com carbonato de bário (BaCO_3), e filtrada. O filtrado foi tratado em resina catiônica (Dowex 50W x 8, forma H^+), novamente filtrado e seu volume foi reduzido sob pressão reduzida. O polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPH) foi obtido por precipitação com excesso de etanol. O rendimento foi de 44% (2,35 g). Na Figura 05 está esquematizado o procedimento acima descrito.

3.7 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

3.7.1 Polissacarídeo obtido por hidrólise ácida parcial (PPH)

O procedimento de degradação controlada de Smith foi realizado segundo DYER (1956), GOLDSTEIN *et al.* (1965), HAY *et al.* (1965) e GORIN *et al.* (1965) e está esquematizado na Figura 05.

O polissacarídeo submetido à hidrólise ácida parcial (PPH) (0,6 g) foi solubilizado em 50 mL de água destilada e oxidado com NaIO_4 (3,0 g) por 24 horas, a temperatura ambiente, no escuro. Após adição de etilenoglicol (5 mL) e diálise, foi feita a redução com NaBH_4 (2,0 g), por 3 horas. A mistura foi

acidificada com ácido acético e dialisada em água corrente e em água destilada, por 20 horas cada, respectivamente. Uma alíquota do poliálcool foi utilizada para análise em CG-EM. O restante do poliálcool foi submetido à hidrólise ácida parcial em pH 2,0 (ajustado com H_2SO_4), por 1 hora, a 100°C , com posterior neutralização com BaCO_3 e filtração. O filtrado obtido foi evaporado e precipitado com etanol em excesso, obtendo-se um material insolúvel (0,18 g, 30% de rendimento), correspondendo ao polissacarídeo obtido a partir da degradação controlada de Smith do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPHDS1), o qual foi caracterizado por CG-EM e espectroscopia de RMN- ^{13}C .

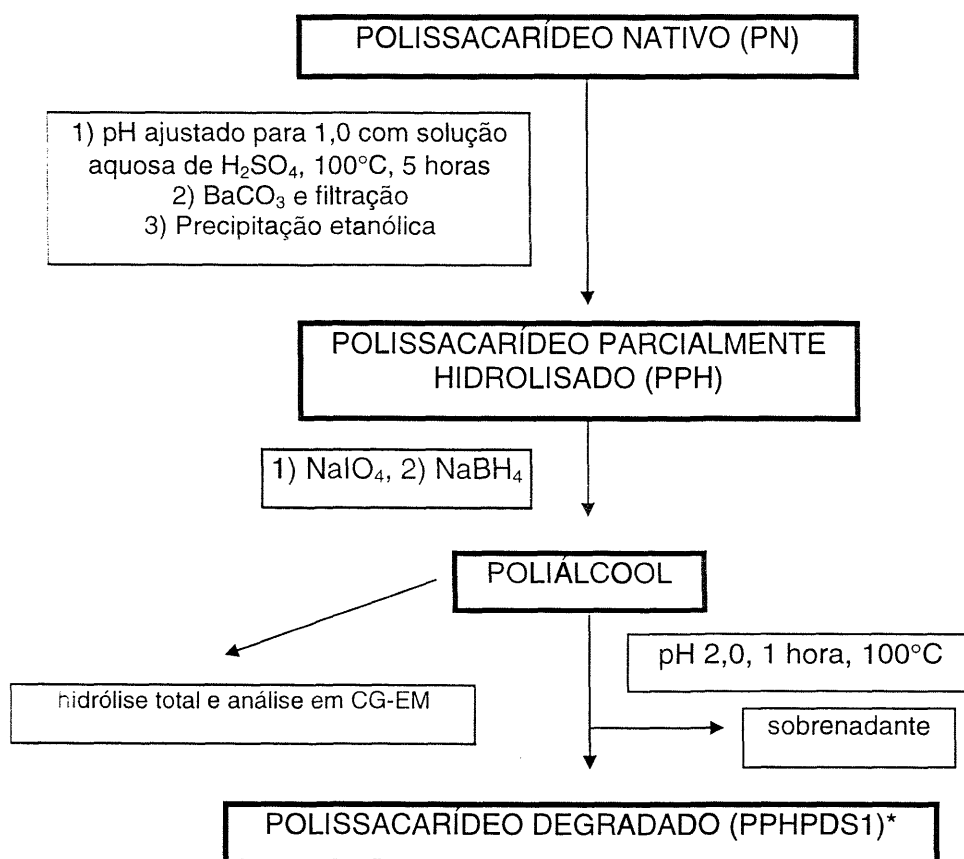


Figura 05: Esquema da hidrólise ácida parcial do PN e do procedimento da degradação controlada de Smith do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPH).

* O polissacarídeo PPHPDS1 foi analisado por CG-EM e espectroscopia de RMN, como descrito no texto.

3.7.2 Polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de *Anacardium occidentale*

O procedimento de degradação controlada de Smith sequenciada do polissacarídeo nativo (PN) está esquematizado na Figura 06.

O polissacarídeo (PN) (6,58 g) dissolvido em água (200 mL) e mantido com uma solução oxidante de NaIO_4 (20,0 g), por 48 horas, temperatura ambiente, no escuro, em seguida tratado com etilenoglicol (5 mL) e dialisado. Foi adicionado NaBH_4 (2,0 g) e após 3 horas, a mistura foi acidificada com ácido acético e dialisado em água corrente e em água destilada, por 20 horas cada, respectivamente.

Um alíquota do POLIÁLCOOL-1 resultante foi utilizada para determinar sua composição, sendo submetida a uma hidrólise ácida total e posteriormente, analisada em CG-EM. A fração majoritária restante do POLIÁLCOOL-1 foi submetida à hidrólise ácida parcial. A solução foi evaporada até 100 mL, ajustado o pH para 2,0 com uma solução aquosa de H_2SO_4 , aquecido a 100°C , por 1 hora, neutralizado com BaCO_3 e filtrado. O filtrado foi evaporado até 20 mL e adicionado etanol (200 mL) obtendo-se um precipitado, o qual foi dissolvido em água destilada, liofilizado e redissolvido em água destilada, e posteriormente, filtrado para remoção do residual de BaCO_3 . O filtrato obtido, correspondendo ao PDS1, foi liofilizado, analisado por CG-EM (após hidrólise ácida total) e por espectroscopia de RMN- ^{13}C . O sobrenadante, foi cromatografado em coluna de celulose, e a eluição feita com acetona:água (10:1 e 3:1, v/v), obtendo-se uma fração (260 mg), a qual foi analisada por cromatografia em papel, mostrando a

presença de duas frações com R_f de 0,31 e 1,20.

O polissacarídeo PDS1 (1,56 g), foi submetido a uma segunda degradação controlada de Smith, sendo dissolvido em água destilada (100 mL), a 100°C, por 1 hora, e após foi oxidado com adição de NaIO_4 (3,0 g), como descrito anteriormente, obtendo-se o POLIÁLCOOL-2 o qual, após hidrólise ácida total foi analisado por CG-EM. O procedimento da hidrólise ácida parcial foi repetido. O polissacarídeo resultante (PDS2) (0,74 g), obtido por precipitação acetona:etanol (1:1 v/v), foi analisado por CG-EM (após hidrólise ácida total) e por espectroscopia de RMN- ^{13}C . O material obtido do sobrenadante foi de 0,21 g.

O polissacarídeo PDS2 (0,5 g) foi submetido a uma terceira degradação controlada de Smith, obtendo-se o POLIÁLCOOL-3, que após hidrólise e derivatização foi analisado por CG-EM, e o polissacarídeo PDS3 (224 mg), que foi submetido a análise por CG-EM e espectroscopia de RMN- ^{13}C . O sobrenadante etanólico formado, após evaporação, foi de 240 mg.

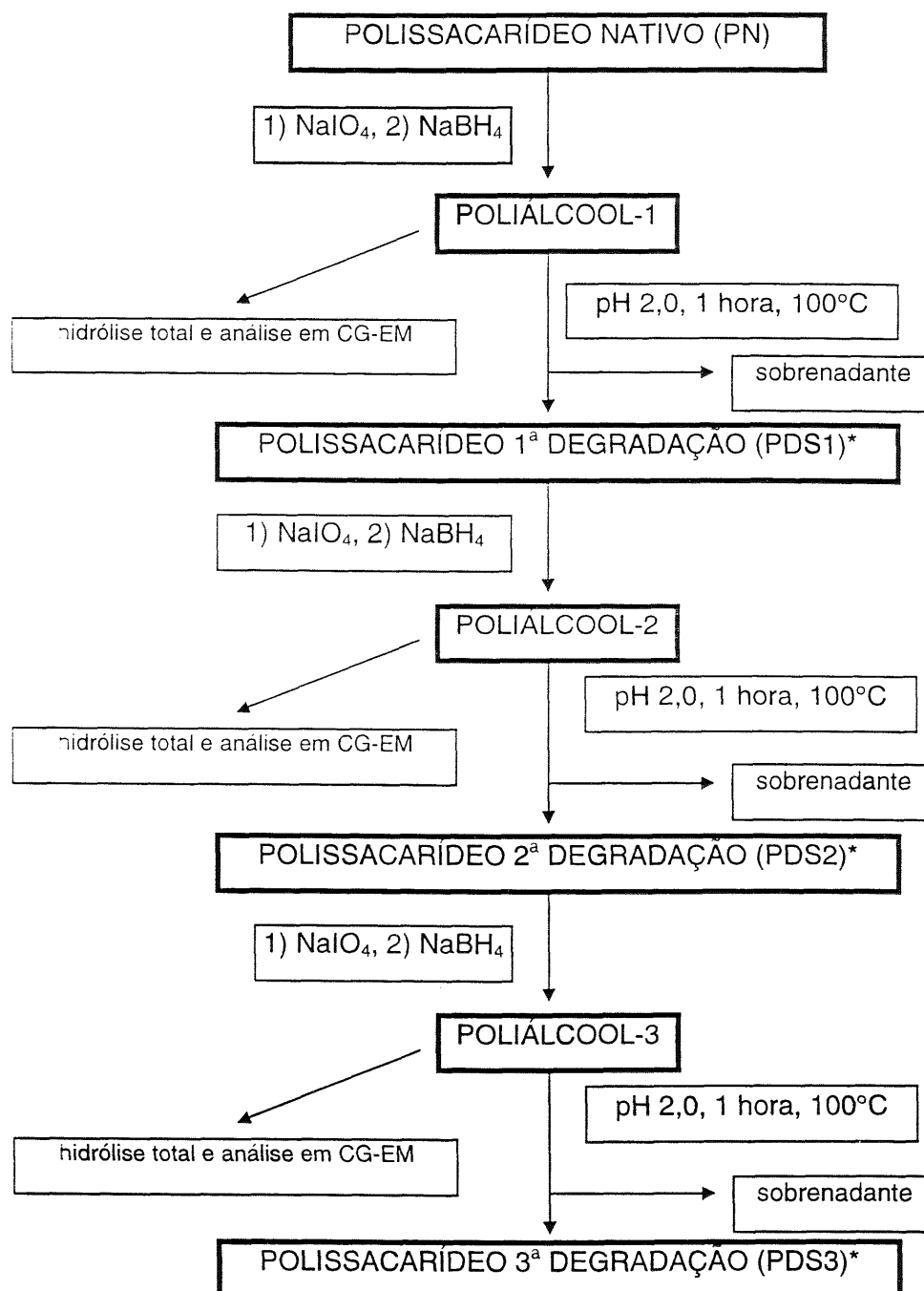


Figura 06: Esquema do procedimento da degradação controlada de Smith sequenciada do polissacarídeo nativo (PN).

* Os polissacarídeos PDS1, PDS2 e PDS3 foram analisados por CG-EM e espectroscopia de RMN, como descrito no texto.

3.8 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO (PN) DO EXSUDATO VEGETAL DE *Anacardium occidentale*

Para obtenção dos oligossacarídeos por hidrólise ácida parcial, o polissacarídeo nativo (PN) (4,12 g) foi solubilizado em água destilada (150 mL), a esta solução foi adicionado 12,5 mL de TFA 1 M, a qual foi mantida a 100°C, por 7 horas. Após isso, o TFA e a água foram removidos por evaporação.

O hidrolisado redissolvido em água destilada, precipitado com etanol em excesso, e o sobrenadante resultante foi fracionado por cromatografia de adsorção através de um filtro de carvão-celite (terra de infusórios), na proporção (1:1, p/p) (40 g) (WHISTLER & BEMILLER, 1962a; LEMIEUX, 1962). A eluição foi feita com um gradiente descontínuo de água destilada (3 L) e etanol aquoso 30% (2 L). A fração obtida da eluição com etanol 30% apresentou um rendimento de 12,8% (0,53 g). Esta fração, foi posteriormente, fracionada em CP (Whatman nº3, solvente nº 2).

3.9 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS

A composição monossacarídica dos polissacarídeos e oligossacarídeos foi verificada em CP e quantificada por análise através de CG-EM, precedida da hidrólise total da amostra com ácido trifluoracético 2 M, por 8 horas, a 100°C

(GORIN *et al.*, 1996) ou com H_2SO_4 0,5 M por 18 horas, a 100°C , com posterior redução e acetilação dos produtos da hidrólise (WOLFROM & THOMPSON, 1963ab).

3.9.1 Determinação da configuração absoluta dos componentes monossacarídicos do polissacarídeo nativo

O polissacarídeo PN foi submetido à hidrólise ácida total, conforme descrito no item 3.9. A partir do hidrolisado, obteve-se um resíduo que na presença de uma solução de metanol:etanol (1:1, v/v) forneceu cristais de galactose, o qual foi analisado pelo espectro de RMN ^{13}C e por polarimetria. O sobrenadante resultante do processo de cristalização foi fracionado por cromatografia de partição em celulose, e a eluição foi feita com acetona e acetona:água (10:1, v/v). As frações obtidas foram analisadas por RMN ^{13}C e na forma de derivados acetatos dos seus (-)-2-octilglicosídeos por CG-EM. Utilizou-se coluna capilar Durowax-4 (30 m x 0.25 mm d.i.), com temperatura programada ($40^\circ\text{C}/\text{min}$) de 50°C (durante a injeção) até 230°C (constante) (GORIN *et al.*, 1985).

3.10 ANÁLISES DE METILAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos (50 mg) foram parcialmente metilados pelo método de HAWORTH (1915), o qual permitiu obter produtos solúveis para o meio de reação de CIUCANU & KEREK (1985). A metilação foi completa usando o procedimento de KUHN *et al.* (1955). O procedimento completo da metilação será descrito abaixo.

Antes do processo de metilação, os polissacarídeos foram reduzidos com

boreidreto de sódio, à temperatura ambiente, por 12 horas. Posteriormente, à solução de polissacarídeo, foi adicionado 3 g de NaOH dissolvidos em 7 mL de água. e foram feitas 8 adições de sulfato de dimetila (0,27 mL cada), em intervalos de 20 em 20 minutos, sob agitação constante, à temperatura ambiente (HAWORTH, 1915). Após 18 horas, a reação foi interrompida, pelo aquecimento a 100°C. sob refluxo, por 30 minutos, eliminando o excesso de sulfato de dimetila. Após o resfriamento, a solução foi neutralizada pela adição de ácido acético glacial. sendo, posteriormente dialisada em água corrente por 48 horas, e em água destilada por 24 horas. A solução de polissacarídeo foi liofilizada e submetida ao procedimento de metilação descrito por CIUCANU & KEREK (1985). O material parcialmente metilado foi solubilizado em DMSO, adicionando, subsequentemente, NaOH pulverizado e iodeto de metila, agitando-se em vortex, por 30 minutos. O material foi dialisado em água corrente, por 48 horas e posteriormente liofilizado. O material, então, foi submetido ao procedimento descrito por KUHN *et al.* (1955). O polissacarídeo foi dissolvido em dimetilformamida (3 mL), com adição de iodeto de metila (3 mL) e óxido de prata (Ag_2O) (1 g), a cada 24 horas, sob agitação constante, à temperatura ambiente, e na ausência de luz. Decorridas 72 horas, o processo foi interrompido pelo acréscimo de diclorometano, sendo a amostra filtrada, evaporada e liofilizada.

3.10.1 Metanólise de produtos O-metilados

Os produtos O-metilados foram submetidos ao procedimento de metanólise, sendo refluxados com metanol em HCl 3%, por 3 horas, e depois

neutralizou-se com carbonato de prata, filtrando e lavando o resíduo com acetona, sendo o sobrenadante evaporado até a secura (GORIN & IACOMINI, 1984). As amostras foram então hidrolisados com H_2SO_4 1 M, a 100°C , por 18 horas. A neutralização foi feita com carbonato de bário e o filtrado foi reduzido com NaB^2H_4 e acetilado. Os alditóis acetatos parcialmente metilados foram examinados em CG-EM, nas colunas OV-225 e DB-210 (30 m x 0,25 mm d.i.). Foram utilizadas 2 colunas, em virtude da sobreposição dos isômeros de Rha, Ara, e Gal. Em OV-225, ocorre sobreposição dos isômeros 2,3,5- Me_3 -Ara (447 s) e 2,3,4- Me_3 -Rha (443 s), e também dos isômeros de 2,4- Me_2 -Ara (545 s), 3,4- Me_2 -Ara (542 s), e 2,3,4,6- Me_4 -Gal (542 s). Sendo possível identificar os derivados 2,5- Me_2 -Ara (509 s), 3,5- Me_2 -Ara (499 s), e 2,3- Me_2 -Ara (537 s). Em DB-210, 2,5- Me_3 -Ara (533 s) e 2,3,4,6- Me_4 -Gal (533 s) estão sobrepostos. Podendo identificar os derivados 3,5- Me_2 -Ara (519 s), 2,3- Me_2 -Ara (577 s), 3,4- Me_2 -Ara (571 s), 2,4- Me_2 -Ara (558 s), 2,3,4,6- Me_4 -Gal (533 s), 2,3,5- Me_3 -Ara (462 s), e 2,3,4- Me_3 -Rha (469 s).

3.10.2 Carboxi-redução dos polissacarídeos per-O-metilados

O polissacarídeo per-O-metilado (5 mg) foi dissolvido em tetra-hidrofurano seco (0,5 mL) e lítio alumínio deuterado (LiAlD_4) (2 mg) (LINDBERG *et al.*, 1972). Após 3 horas, o reagente foi decomposto com excesso de acetato de etila, seguido por ácido acético. A mistura foi diluída com excesso de diclorometano, o material insolúvel foi removido e a solução evaporada até à secura, posteriormente sendo submetido ao processo de metanólise, hidrólise ácida total, redução, acetilação e análise em CG-EM.

3.11 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.11.1 Cromatografia de partição em papel (CP) e em camada delgada (TLC)

Os cromatogramas em papel foram feitos pelo método descendente, em papel Whatman nº 1 ou nº 3, para análises analíticas ou preparativas, respectivamente. Para a cromatografia em camada delgada utilizou-se placas de alumínio revestidas de celulose. Foram utilizados os seguintes tipos de misturas de solventes: (Solvente nº 1) *n*-butanol:piridina:água (5:3:3, v/v); (Solvente nº 2) *n*-butanol:piridina:água (1:1:1, v/v); (Solvente nº 3) *n*-butanol:etanol:água (1:1:1, v/v); (Solvente nº 4) acetato de etila:ácido acético:água (2:1:1, v/v) (HOUGH & JONES, J.K.N., 1962).

Para revelação das cromatografias foram utilizados os métodos descrito por TREVELYAN *et al.*, (1950), para a detecção dos açúcares com nitrato de prata e hidróxido de sódio, e o descrito por HOUGH *et al.*, (1950), para a detecção de açúcares redutores com cloridrato de *p*-anisidina.

3.11.2 Cromatografia líquida gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafo a gás Varian, modelo 3300 acoplado a um espectrômetro de massa Finnigan MAT modelo ITD 800. utilizando uma coluna capilar de OV-225 ou DB-210 (30 m x 0,25 mm d.i.),

aquecido a 50°C durante a injeção e então programada a 40°C/min até 220°C (constante).

3.11.2.1 Preparo das amostras para análise em CG-EM

As amostras (3 a 5 mg) analisadas em CG-EM foram submetidas a hidrólise total em TFA 2 M, 100°C, por 8 horas (GORIN *et al.*, 1996) ou em solução aquosa de H₂SO₄ 0,5 M, 100°C, por 18 horas. Após a hidrólise com H₂SO₄ a solução foi neutralizada com BaCO₃. Uma parte do solvente foi analisado por CP, nas condições descritas acima. Outra parte da mistura de monossacarídeos obtida foi dissolvida em água destilada e reduzida com NaBH₄, por 12 a 18 horas, em temperatura ambiente (WOLFROM & THOMPSON, 1963a). A reação foi interrompida pela adição de ácido acético, e a solução foi tratada com resina catiônica (Dowex 50W x 8, forma H⁺) para remoção dos íons sódio. Após filtração a solução foi concentrada sob pressão reduzida e o ácido bórico formado foi removido por co-destilação com metanol sob a forma de borato de trimetila (SLONEKER, 1972).

Os alditóis obtidos foram acetilados na presença de uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1 v/v) (WOLFROM & THOMPSON, 1963b) por 1 h, a 100°C (estufa). O processo foi interrompido pela adição de gelo moído ao sistema. Os alditóis acetatos foram extraídos com clorofórmio e a fase aquosa foi removida utilizando-se uma pipeta Pasteur. A fase clorofórmica foi submetida a sucessivos tratamentos com solução aquosa de sulfato de cobre (CuSO₄) a 2% (p/v), para remoção da piridina residual. A eliminação total do cobre remanescente foi feita

por lavagens com água destilada da fração clorofórmica (processo repetido 3 vezes). Então, para promover a desidratação da fase clorofórmica foi feita a adição de sulfato de sódio anidro, seguida de filtração. Os alditóis acetatos obtidos foram evaporados até secura e posteriormente analisados em CG-EM.

3.11.3 Cromatografia de exclusão estérica (SEC) acoplada a múltiplos detectores

3.11.3.1 Determinação da massa molecular média ponderal em massa (M_w) e massa molecular média em número (M_n)

As massas moleculares médias ponderais (em massa e em número) do polissacarídeo foram determinadas usando através do método dinâmico de difusão de luz no Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales - CERMAV, Grenoble, França, (BILLMEYER, 1962). A solução aquosa do polissacarídeo a 0,1% (p/v), foi previamente filtrada através de membranas de acetato de celulose (Millipore), com tamanho de poro de 0,2 μm , sob pressão. Em seguida, a solução polissacarídica foi injetada em cromatógrafo de exclusão estérica modelo 150 C ALC/GPC Waters (Milford, Massachusetts), com um detector de índice de refração diferencial modelo Waters, e um detector de difusão de luz em multiângulos (18 ângulos) (633 nm), o qual permite medir a intensidade dos feixes espalhados em diferentes ângulos, modelo Dawn DSP-F, Wyatt Technology (Saint Barbara, California, EUA), acoplados em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_3 0,1 M com NaN_3 a 0,02%, com fluxo de 1 mL/min e uma pressão de 35 bar. Foram usadas duas colunas de gel-permeação

Shodex OH-pack B 804 e B 805 (Showa Denko, Japão), em série. O experimento foi realizado a 30°C.

Os detectores de índice de refração e difusão de luz permitem a extrapolação gráfica da concentração e da massa molecular, respectivamente. A determinação exata dos valores é realizada através de análise informatizada eletrônica. Os programas ASTRA-PC 3,02 e EASI 7,02 (Wyatt Technology) monitoram os detectores de índice de refração e difusão de luz. Através dos cromogramas pode-se calcular as massas moleculares médias em massa (M_w) e em número (M_n). O valor obtido para dn/dc (taxa de variação do índice de refração com a concentração) foi de 0,136 mL/g.

3.11.4 Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e derivatização dos oligossacarídeos livres por redução com 2-aminobenzamida

Os oligossacarídeos livres obtidos no sobrenadante etanólico (50-100 µg) foram derivatizados com 2-aminobenzamida (2-AB) utilizando-se kit da marca Sigma (Oxford Glycosystems, Abingdon, Reino Unido), como recomendado pela técnica (BIGGE *et al.*, 1995). O 2-aminobenzamida é um composto fluorescente derivado orto-substituído da anilina. Após a etapa de redução, as amostras foram secas em centrífuga a vácuo, ressuspensas em solução aquosa e usadas diretamente para análise em HPLC. O sistema de HPLC consistiu em uma bomba de gradiente P2000 (Spectraphysics), um injetor manual (Rheodyne), um detector de UV modelo 100 (Spectraphysics), e um integrador SP4270 (Spectraphysics). Utilizou-se a coluna Hypercarb (7 µm, 4,6 mm x 10 cm, Life Sciences International,

Basingstoke, Reino Unido) e um gradiente de 2 a 50% de acetonitrila em água contendo TFA 0,05% (v/v). A detecção foi monitorada em 330 nm. Essas análises foram realizadas pelo professor Dr. Christopher Jones, no National Institute for Biological Standards and Control, na Inglaterra.

3.12 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO TREZE E PRÓTON (RMN- ^{13}C E RMN- ^1H)

3.12.1 Oligossacarídeos livres

Os oligossacarídeos livres obtidos no sobrenadante etanólico, foram analisados por RMN- ^{13}C e ^1H , além dos programas de COSY, DQFCOSY (Double quantum filtered COSY), TNDQFCOSY (Double quantum filtered COSY, com pré saturação do solvente) e HMQC em espectrômetro Varian Unity 500 MHz, equipado com “probe” de ressonância tripla de 5 mm. Com ressonância em 500,00 e 125,00 MHz, para os espectros de ^1H e de ^{13}C , respectivamente. As amostras foram liofilizadas duas vezes com água deuterada (99,9%, Goss Scientific, Ingatestone, Reino Unido) e os espectros obtidos a 30°C e usando pré-saturação da ressonância de DOH. Utilizou-se o íon acetato (AcO^-) (δ 1,90 - ^1H ; δ 20,5- ^{13}C) como referência interna. Essas análises foram realizadas pelo professor Dr. Christopher Jones, no National Institute for Biological Standards and Control, na Inglaterra.

3.12.2 Polissacarídeos (PN, PPH, PPHDS1, PDS1, PDS2 e PDS3) e oligossacarídeos provenientes de hidrólise ácida parcial

Os espectros foram obtidos usando aparelho BRUKER 400 MHz, modelo DRX, a 30°C ou 70°C em D₂O usando pré-saturação da ressonância de DOH. Com ressonância em 400,13 e 100,61 MHz, para os espectros de ¹H e de ¹³C, respectivamente. Para o espectro de ¹³C (a 30°C), o solvente foi D₂O, exceto para os polissacarídeos obtidos na degradação controlada de Smith, para os quais foi utilizado NaOH a 5% (p/v) em D₂O.

Os deslocamentos químicos foram expressos em δ ppm, baseando-se no padrão de tetrametilsilano ($\delta = 0$).

3.13 ESPECTROMETRIA DE MASSA - ESI-MS (Electrospray-ionisation-mass spectrometry)

Para análise da massa molecular dos oligossacarídeos livres presentes no exsudato de *A. occidentale*. Utilizou-se o equipamento Micromass Quattro LC duplo quadrupolo. Os espectros foram obtidos no modo íon-negativo, com calibração por Csl (iodeto de cério). O solvente de análise foi água destilada com ácido fórmico a 0,05% (v/v): acetonitrila (1:1). As amostras foram diluídas em água destilada com ácido fórmico a 0,05% (v/v) e em seguida, diluídos em acetonitrila, na proporção 1:1. Para a aquisição dos espectros foi utilizado uma faixa de massa de 100 a 900 m/z, inter delay scan de 0,10 s em sistema de

aquisição de dados contínuo, tempo de aquisição de 1,60 s a 0,20 s.

3.14 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

3.14.1 Dosagem de açúcares totais

Os açúcares totais foram dosados pelo método do fenol-ácido sulfúrico, como descrito por DUBOIS *et al.*, (1956). O princípio deste método, baseia-se na reação do ácido sulfúrico sobre o carboidrato, retirando duas moléculas de água, formando o hidroximetilfurfural (para as hexoses) e o furfural (para as pentoses), os quais reagem com o fenol formando um complexo colorido que é medido por espectrofotometria, em 490 nm. A sensibilidade deste método é de 8 a 70 µg de carboidrato. O açúcar padrão utilizado foi a D-glucose (40 µg/mL).

3.14.2 Determinação de ácido urônico

Para a dosagem de ácido urônico presente nas amostras foi utilizado o método do *m*-hidroxibifenil descrito por BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, (1973). Na técnica, utilizou-se 0,4 mL de amostra, em 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio (0,0125 M) em ácido sulfúrico concentrado, a qual foi aquecida (5 min, 100°C), e posteriormente adicionado 40 µL de *m*-hidroxibifenil (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v). Forma-se um cromógeno que apresenta absorção em 520 nm. Como o carboidrato produz um complexo colorido na presença da solução de tetraborato de Na em H₂SO₄ (a 100°C), utilizou brancos para cada concentração

de amostra testada, adicionando-se ao sistema 40 μL de NaOH 0,5% p/v, em vez da solução de *m*-hidroxibifenil. As absorbâncias desses brancos foram subtraídas da absorbância total da amostra. A sensibilidade deste método é de 0,5 a 20 μg de ácido urônico. A percentagem de ácido urônico foi calculada a partir de uma curva de calibração, utilizando concentrações de 1 a 20 μg de ácido D-glucurônico (forma Na).

3.14.3 Determinação de proteína

As dosagens de proteínas foram feitas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se a albumina do soro bovina como padrão. O método baseia-se no princípio da formação de um complexo pela ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue G-250) a proteína. Este complexo apresenta um alto coeficiente de extinção levando à alta sensibilidade do método. A ligação do corante à proteína é um processo muito rápido (2 min) e este complexo permanece disperso em solução por aproximadamente 1 hora. A leitura do complexo formado é realizada em 595 nm. A sensibilidade do método varia de 1 a 100 μg de proteína. Para dosagem de proteína, utilizou-se 100 μL de uma solução de polissacarídeo (10 mg/mL) e 1 mL do corante.

3.15 POLARIMETRIA

A rotação específica foi determinada em polarímetro RUDOLPH RES. 589, a 25°C, utilizando soluções de amostra de 0,3 a 0,6% (p/v) em água destilada,

exceto para os polissacarídeos de degradação controlada de Smith, no qual o solvente foi água destilada contendo NaOH a 3% (p/v). Os valores experimentais do ângulo de desvio da luz plano-polarizada, α ($^{\circ}$), fornecidos pelo aparelho, foram utilizados para o cálculo da rotação óptica específica, $[\alpha]_D^{25}$ das soluções, conforme a equação (EWING, 1972).

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha}{Lc} \times 100$$

Onde L = comprimento do caminho óptico (dm)

c = concentração da solução (g%)

3.16 MÉTODOS ANALÍTICOS ELEMENTARES

a) As pesagens foram realizadas em balanças analíticas Mettler Toledo, modelo AB204, e Sauter, modelo KGD-7470.

b) As evaporações sob pressão reduzida foram realizadas em evaporador rotatório, a vácuo (pressão reduzida), FISATOM 803, em banho-maria com temperatura inferior a 40°C.

c) As medições de pH foram realizadas em potenciômetro Micronal, modelo B374.

d) Para as determinações espectrofotométricas foram utilizados os aparelhos da marca TECNAL (modelo DME-21) e HITACHI (modelo U-2001).

e) As centrifugações foram feitas em centrífugas Beckman, modelo GS-15 (9.000 r.p.m., temperatura ambiente).

f) As diálises foram feitas em tubos de celulose benzoilados (limite de exclusão molecular de 14.000).

g) As liofilizações de soluções ocorreram em aparelhos Cryoliser (New Brunswick Scientific Co. Inc.) e Edwards.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR PRESENTES NO EXSUDATO DE *Anacardium occidentale* L. (CAJUEIRO)

4.1.1 Quantificação dos monossacarídeos livres presentes no exsudato de *A. occidentale*

Como mostrado, anteriormente, na Figura 04 (página 50), após a extração aquosa e a precipitação etanólica do exsudato vegetal de *A. occidentale*, obteve-se um sobrenadante com 0,87% de rendimento em relação a goma bruta. Em cromatografia de partição em papel, foi verificada que este sobrenadante apresenta-se como uma mistura de mono- e oligossacarídeos, conforme observado na Figura 07 (página 74).

A goma foi dissolvida em água, contendo boroidreto de sódio com o objetivo de alcalinizar o meio (pH 12). Em outro experimento a goma foi dissolvida em água na ausência de boroidreto de sódio, sendo que esta solução apresentou um pH de 5,5 a 6,0. Posteriormente, em ambos experimentos, foi adicionado boroidreto de sódio na etapa de redução dos monossacarídeos livres. A quantidade de monossacarídeos, determinada como alditóis acetatos por CG-EM, foi semelhante nos dois experimentos realizados, sendo 0,005% de ramnose, 0,03% de arabinose, 0,007% de manose, 0,03% de galactose e 0,02% de glucose. Indicando que nos pH testados, não foi verificada variação da quantidade de monossacarídeos presentes no exsudato em estudo.

4.1.2 Purificação e determinação da composição monossacarídica dos componentes de baixa massa molecular presentes, livremente, no exsudato de *A. occidentale*

O sobrenadante etanólico (2,175 g) obtido a partir da extração aquosa da goma do cajueiro (250 g), foi submetido a uma cromatografia de adsorção em carvão-terra de infusórios, e eluído em água destilada (fração A), etanol aquoso 30% (fração E30%) e 50% (fração E50%). Obteve-se um rendimento, em relação ao sobrenadante etanólico, de 44,2% (797 mg), 43,3% (781 mg) e 12,5% (226 mg), das frações A, E30% e E50%, respectivamente. Os rendimentos das frações A, E30% e E50% calculados, em relação à goma nativa, foram de 0,32%, 0,31% e 0,09%. O rendimento total da cromatografia de adsorção em carvão-terra de infusórios, foi de 83%, em relação ao sobrenadante etanólico.

O perfil cromatográfico das frações obtidas pela coluna de carvão-terra de infusórios do sobrenadante etanólico do exsudato do cajueiro é mostrado na Figura 07.

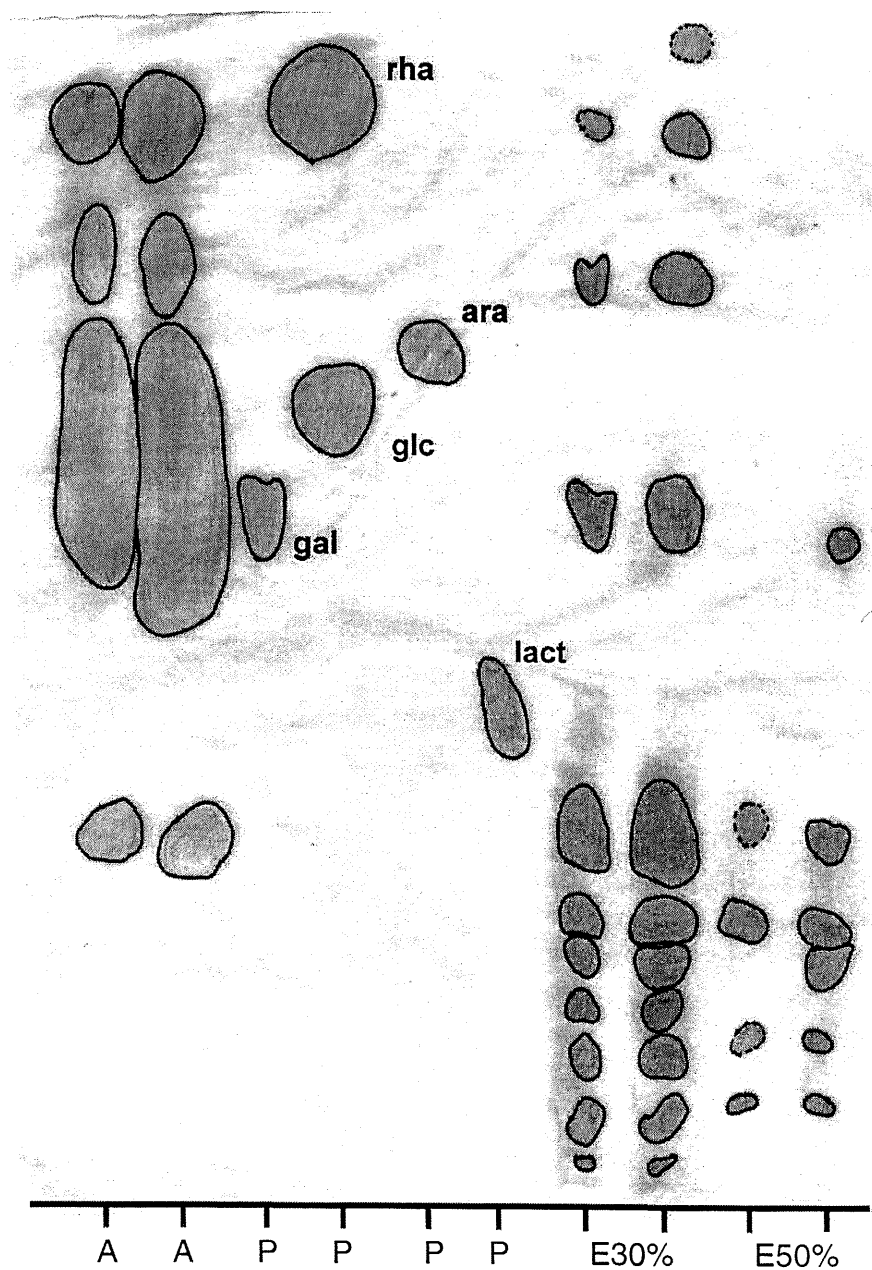


Figura 07: Perfil cromatográfico* das frações obtidas em cromatografia de adsorção em carvão-terra de infusórios do sobrenadante etanólico do exsudato do cajueiro.

* cromatografia de partição em papel (Whatman nº 1), solvente nº 2, revelador cloridrato de *p*-anisidina, tempo de corrida 24 horas. A- fração eluída com água destilada; E30% - fração eluída com etanol aquoso 30%; E50% - fração eluída com etanol aquoso 50%; P- rões de açúcares.

Em virtude, do perfil cromatográfico da fração A, mostrando a presença de monossacarídeos livres e um componente com R_{lact} de 0,83 (calculado em CP, solvente nº 2), optou-se em submetê-la a CP preparativas e semi-preparativas (Whatman nº3, solvente *n*-butanol:piridina:água, 1:1:1, v/v - solvente nº 2), com o objetivo de purificar este componente, denominado de fração $F_{0,83}$. A pureza desta fração foi observada em cromatografia de camada delgada em celulose (TLC-celulose), mostrada na Figura 08 (página 76). Os resultados obtidos para esta fração, em relação ao rendimento, R_{lact} em diferentes solventes e a composição monossacarídica, estão mostrados na Tabela III (página 77).

Pelo perfil cromatográfico das frações E30% e E50%, observando-se vários componentes com R_{lact} entre 0,82 a 0,32 (CP, solvente nº 2), submeteu-se essas frações, separadamente, à cromatografia de partição em coluna de celulose. A eluição foi feita com acetona:água, nas proporções 7:1, 4:1, 3:1 e 5:2 e as frações obtidas com os diferentes solventes de eluição, foram monitoradas por CP (solvente nº 2) .

Os rendimentos calculados para as colunas em celulose das frações E30% e E50% foram de 33,55% e 13,30%, respectivamente, em relação ao peso das frações E30% e E50% obtidas pela cromatografia de adsorção em carvão-terra de infusórios.

As frações obtidas a partir das colunas de celulose, que apresentaram um perfil cromatográfico semelhante, foram reunidas, e então submetidas a CP semi-preparativas e preparativas (Whatman nº 3, solvente nº 2), para obter as frações purificadas.

A pureza das frações purificadas por CP preparativas e semi-preparativas,

foi verificada em TLC-celulose, utilizando-se diferentes solventes. Na Figura 08 está mostrado o perfil cromatográfico, em TLC-celulose, dessas frações utilizando o solvente n° 2. As frações obtidas foram denominadas de $F_{0,82}$, $F_{0,79}$ e $0,70$, $F_{0,50}$ e $F_{0,32}$, de acordo com seus R_{lact} obtidos em cromatografia em papel (Whatman n° 1, solvente n° 2).

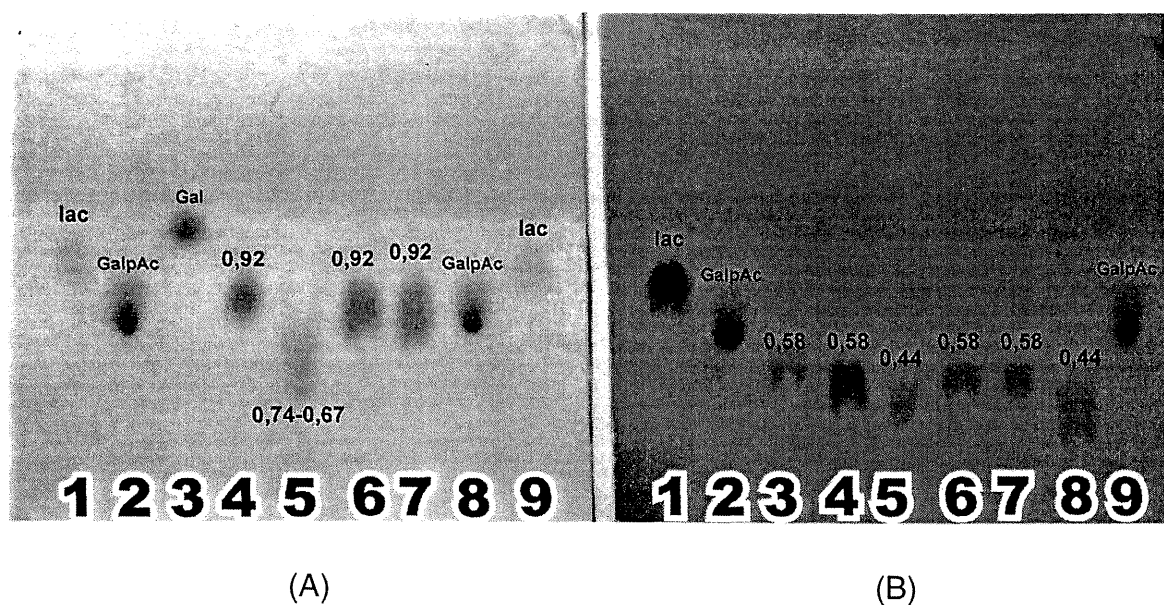


Figura 08: Perfil cromatográfico*, em cromatografia de camada delgada em celulose (TLC - celulose) das frações $F_{0,83}$, $F_{0,82}$, $F_{0,79}$ e $0,70$, $F_{0,50}$ e $F_{0,32}$.

* Solvente n° 2; revelador: cloridrato de *p*-anisidina, tempo de corrida: 1 hora. Placa (A): 1 - lactose; 2 - ácido galacturônico; 3 - galactose; 4 - $F_{0,83}$; 5 - $F_{0,79}$ e $0,70$; 6 - $F_{0,82}$; 7 - $F_{0,82}$; 8 - ácido galacturônico; 9 - lactose. Placa (B): 1 - lactose; 2 - ácido galacturônico; 3 - $F_{0,50}$; 4 - $F_{0,50}$; 5 - $F_{0,32}$; 6 - $F_{0,50}$; 7 - $F_{0,50}$; 8 - $F_{0,32}$; 9 - ácido galacturônico. Observação importante: Nas placas estão mostrados os R_{lact} calculados para as diferentes frações em TLC, solvente n° 2.

Os resultados obtidos para estas frações purificadas, em relação ao rendimento, R_{lact} em diferentes solventes e a composição monossacarídica, estão mostrados, a seguir, na Tabela III.

Tabela III: Rendimentos, R_{lact} e composição monossacarídica das frações obtidas após o procedimento de purificação dos carboidratos de baixa massa molecular do sobrenadante etanólico do exsudato vegetal de *A. occidentale*

Frações	Rendimento (%) *	R_{lact} **			Açúcares constituintes (moles %) ***						
		em CP, solv. 2	em CP, solv. 3	em TLC, solv. 2	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Aldo	Uro
F _{0,83}	0,05% (120 mg)	0,83	1,0	0,92	tr.	100	-	-	tr.	-	-
F _{0,82}	0,003% (12mg)	0,82	0,93	0,92	11,4	82,6	-	-	6,0	-	-
F _{0,79 e 0,70}	0,008% (20 mg)	0,79 e 0,70	0,97	0,74 e 0,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F _{0,50}	0,01 % (25 mg)	0,50	0,77	0,58	3,0	90,0	4,0	tr.	3,0	+	+
F _{0,32}	0,008% (20 mg)	0,32	0,66	0,44	20,0	80,0	tr.	tr.	-	+	+

* Rendimento calculado em relação a goma bruta. Entre parênteses estão as quantidades obtidas em mg.

** Cálculo do R_{lact} → distância (cm) amostra ÷ distância (cm) lactose. Em cromatografia em papel (CP) ou cromatografia em camada delgada - celulose (TLC), utilizando os solventes: *n*-butanol:piridina:água, 1:1:1 (v/v) (solv. n° 2) ou *n*-butanol:etanol:água, 1:1:1 (v/v) (solv. n° 3).

*** Resultados obtidos após hidrólise total e análise em CG-EM (coluna OV-225), com excessão do ácido aldobiurônico (aldo) e ácido urônico (uro), os quais foram detectados por CP. tr. < 1,0. n.d. → não determinado.

Os resultados sobre a determinação da composição monossacarídica das frações obtidas, tanto por PC, como por CG-EM, mostraram, que o monossacarídeo majoritário encontrado nas frações foi a galactose. Além disso, por CP, observou-se que as frações $F_{0,50}$ e $F_{0,32}$, apresentavam ácido urônico como açúcar constituinte. A fração $F_{0,83}$, apresentou-se constituída principalmente por galactose e traços de arabinose e xilose.

A presença de arabinose e xilose nas amostras analisadas, poderia ser proveniente de possíveis contaminações de celulose, em virtude disso, todas as frações foram ressolubilizadas em água destilada e centrifugadas (em microcentrífuga), obtendo-se um sobrenadante límpido e um precipitado residual de celulose.

A pureza das frações $F_{0,83}$, $F_{0,82}$, $F_{0,79}$ e $0,70$, $F_{0,50}$ e $F_{0,32}$ foi verificada também, por HPLC, na forma de seus 2-aminobenzamida derivados. Os resultados obtidos das análises em HPLC das frações purificadas estão, sumarizados, na Tabela IV.

Tabela IV: Análise em HPLC das frações purificadas $F_{0,83}$, $F_{0,82}$, $F_{0,79}$ e $0,70$, $F_{0,50}$ e $F_{0,32}$ na forma de seus 2-aminobenzamida derivados

Frações	Picos obtidos*	Rendimento (%)	2-AB livre*
$F_{0,83}$ e $F_{0,82}$	31,3	90	18,8
$F_{0,79}$ e $0,70$	34,5	21	18,9
	36,2	65	
$F_{0,50}$	29,1	63	18,7
	35,3	22	
$F_{0,32}$	30,4	11	18,6
	37,3	80	

* em tempo de retenção em minutos; 2-AB: 2-aminobenzamida.

A Tabela IV mostra que a análise em HPLC das frações $F_{0,83}$ e $F_{0,82}$ apresenta um pico principal com mesmo tempo de retenção, correspondendo a 90% da amostra total, indicando que estas frações seriam homogêneas e semelhantes. Esses dados coincidem com os obtidos para a composição monossacarídica, observando-se que nessas duas frações, a galactose apresenta-se como constituinte majoritário. Os resultados obtidos da análise em HPLC das frações $F_{0,79}$ e $F_{0,70}$ e $F_{0,50}$ demonstraram que estas frações são heterogêneas. A fração $F_{0,32}$ apresentou um pico principal com 80% de rendimento. Os perfis das análises em HPLC obtidos para cada fração serão mostrados e comentados nos itens posteriores.

As frações $F_{0,83}$, $F_{0,82}$, $F_{0,79}$ e $F_{0,70}$, $F_{0,50}$ e $F_{0,32}$ foram caracterizadas por vários métodos de RMN, utilizando-se a seguinte estratégia geral para caracterização de oligossacarídeos:

- 1) Obtenção pelos espectros monodimensionais de ^1H e ^{13}C , informações em relação a pureza, o número de unidades sacarídicas, a configuração anômérica das unidades constituintes, bem como a presença de substituintes não glicídicos;
- 2) Atribuição, tanto quanto possível, dos assinalamentos obtidos nos espectros de ^1H e ^{13}C , (utilizando-se dados de literatura relacionada);
- 3) Utilização das técnicas bidimensionais de RMN, de correlação [^1H - ^1H], como COSY, DQFCOSY (ou TNDQFCOSY) e TOCSY para os assinalamentos dos prótons e de correlação [^1H - ^{13}C], como, HMQC para os assinalamentos dos carbonos. Pode-se obter os assinalamentos dos prótons pelo espectro de HMQC quando conhecidos os dos carbonos;
- 4) Obtenção das informações dos tipo de ligações e da sequência das unidades

sacarídicas através dos experimentos de correlação [^1H - ^1H] como ROESY e [^1H - ^{13}C] como HMBC.

Essas frações foram também analisadas por espectrometria de massa (ESI-MS), para obtenção das respectivas massas moleculares.

4.1.3 Caracterização estrutural da Fração $F_{0,83}$

O perfil do cromatograma obtido pela análise em HPLC da fração $F_{0,83}$, na forma 2-aminobenzamida derivado, apresentou um pico principal com tempo de retenção de 31,3, com 90% de rendimento, e está mostrado na Figura 09.

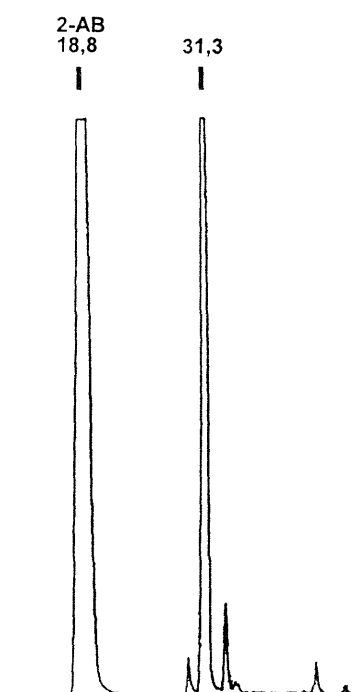


Figura 09: Perfil de eluição* obtido em HPLC, da fração $F_{0,83}$ na forma do derivado 2-aminobenzamida.

* tempo de retenção em minutos; 2-AB livre (2-aminobenzamida).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 10), desta fração, apresentou 19 sinais, sendo característico de um $\alpha\beta$ -dissacarídeo (máximo teórico 24 sinais), constituído de galactose, de acordo com a composição monossacarídica.

Os sinais foram assinalados baseando-se nos dados de RMN- ^{13}C obtidos por ODONMAZIG *et al.* (1994), que isolaram um dissacarídeo $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$, a partir de hidrólise ácida parcial da arabinogalactana isolada de madeira de *Larix dahurica* L. e também os valores obtidos por DELGOBO *et al.* (1998), que também isolaram o mesmo dissacarídeo por hidrólise ácida parcial a partir do polissacarídeo do exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina*.

Na região de C-1, foram obtidos os sinais em δ 103,6 > 103,7 característicos para unidade $\beta\text{-D-Galp}$ não redutora, e em δ 96,8 e 92,8 para $\beta\text{-Gal}$ e $\alpha\text{-D-Galp}$ (unidade redutora), respectivamente. A unidade $\beta\text{-D-Galp}$ (não redutora), apresenta dois sinais (em δ 103,6 > 103,7), que são influenciados pela unidade redutora de galactose (β e α). A padronização dos deslocamentos para a unidade de D-galactose redutora foi feita de acordo com GORIN & MAZUREK (1975) e DELGOBO *et al.* (1998), sendo δ 92,8 e 96,8, para os anômeros α e β , respectivamente.

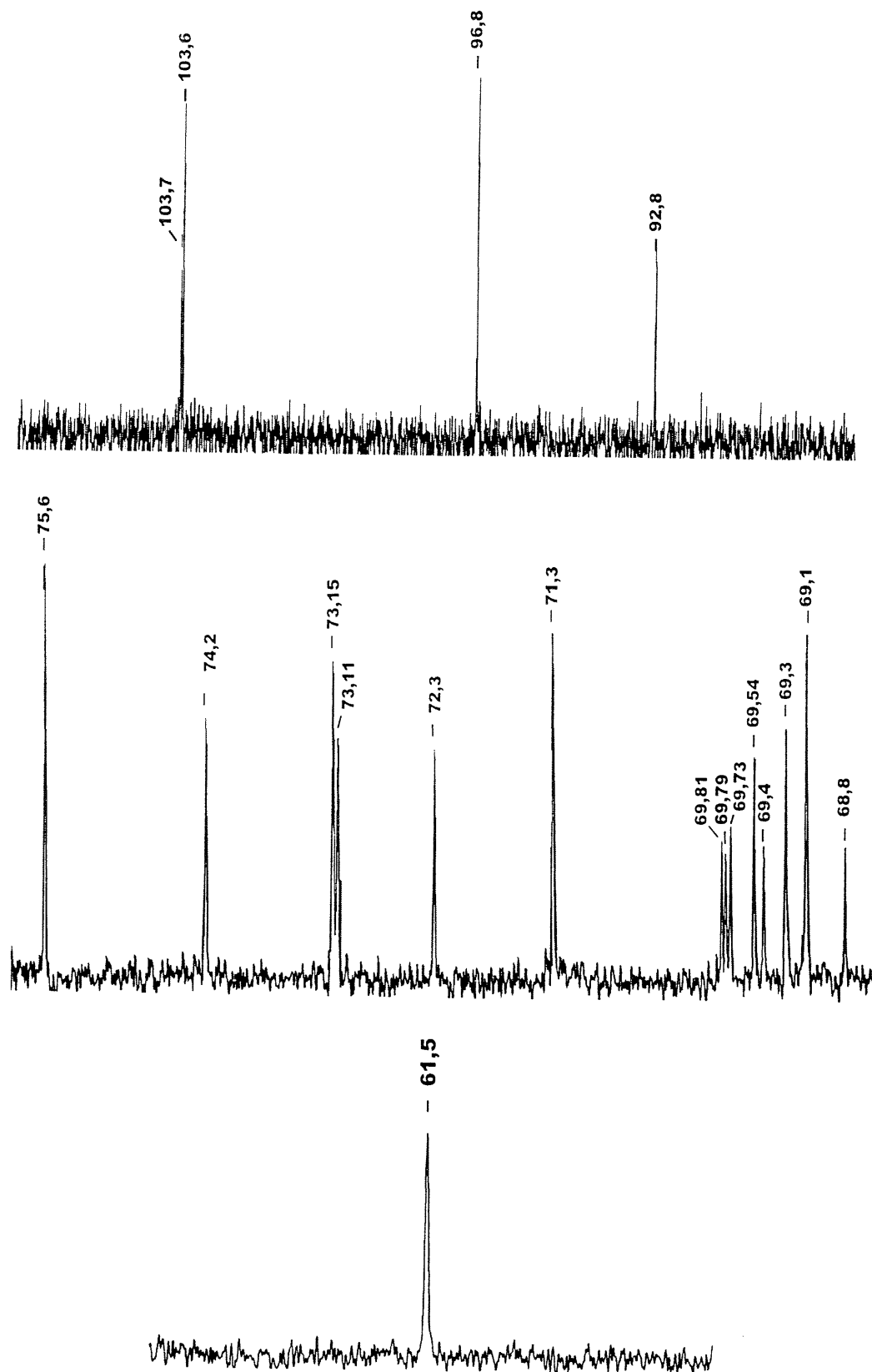


Figura 10: Espectro de RMN - ^{13}C (125 MHz) da fração $F_{0,83}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Para a unidade não redutora, na região de C-2 a C-5, foram assinalados os sinais em δ 71,3 (C-2), 73,15 (C-3), 69,1 (C-4), 75,6 (C-5). Em região de campo mais alto, apenas um sinal em δ 61,5, assinalado para o C-6 não substituído da galactose. Para a atribuição do sinal em δ 69,1 do C-4, considerou-se a intensidade do sinal em relação aos outros sinais atribuídos, em virtude de que nas literaturas citadas (ODONMAZIG *et al.*, 1994; DELGOBO *et al.*, 1998), não estabeleceu-se este assinalamento.

Para unidade redutora, na região de C-2 a C-5, foram assinalados para β -Galp, os sinais em δ 72,3, 73,11 e 74,2, para C2, C3 e C5, respectivamente. O assinalamento para C4 foi atribuído em δ 69,3, considerando a intensidade deste sinal, com relação aos outros sinais desta unidade. Para o C-6 O-substituído foi atribuído o sinal em δ 69,54 utilizando os resultados obtidos por DELGOBO *et al.* (1998). Ocorreu um deslocamento para campo mais baixo do C-6 da galactose, mostrando a presença de ligação do tipo (1 \rightarrow 6) (ADINOLFI *et al.*, 1991). De acordo com ODOMAZIG *et al.* (1994) foram assinalados os mesmos sinais para o C-3 das unidades de β -galactose não redutora e redutora. Porém, neste trabalho pode-se distinguir os sinais de C-3, em δ 73,15 e 73,11 para as unidades de β -galactose não redutora e redutora, respectivamente, considerando a intensidade destes sinais.

Para a unidade de α -Galp, atribuíram-se os sinais em δ 68,8 para o C-2 e em δ 69,81 para o C-6 O-substituído, este último de acordo com a literatura citada (DELGOBO *et al.*, 1998). O sinal em δ 69,78 foi atribuído para o C-5, porém, utilizou-se os dados obtidos com os espectros de ^1H , DQFCOSY e HMQC,

mostrados adiante. Os sinais com mesma intensidade em δ 69,73 e 69,4 correspondem aos C-3 e C-4, porém, não estabeleceu-se os assinalamentos definitivos, mesmo utilizando os outros experimentos de RMN.

O espectro de RMN- ^1H (Figura 11), desta fração, mostrou na região de H-1, os assinalamentos para as unidades redutoras de α -D-Galp, em δ 5,27 (J 4,0 Hz) e de β -D-Galp, em δ 4,60 (maior do que o anômero α) (J 8,0 Hz).

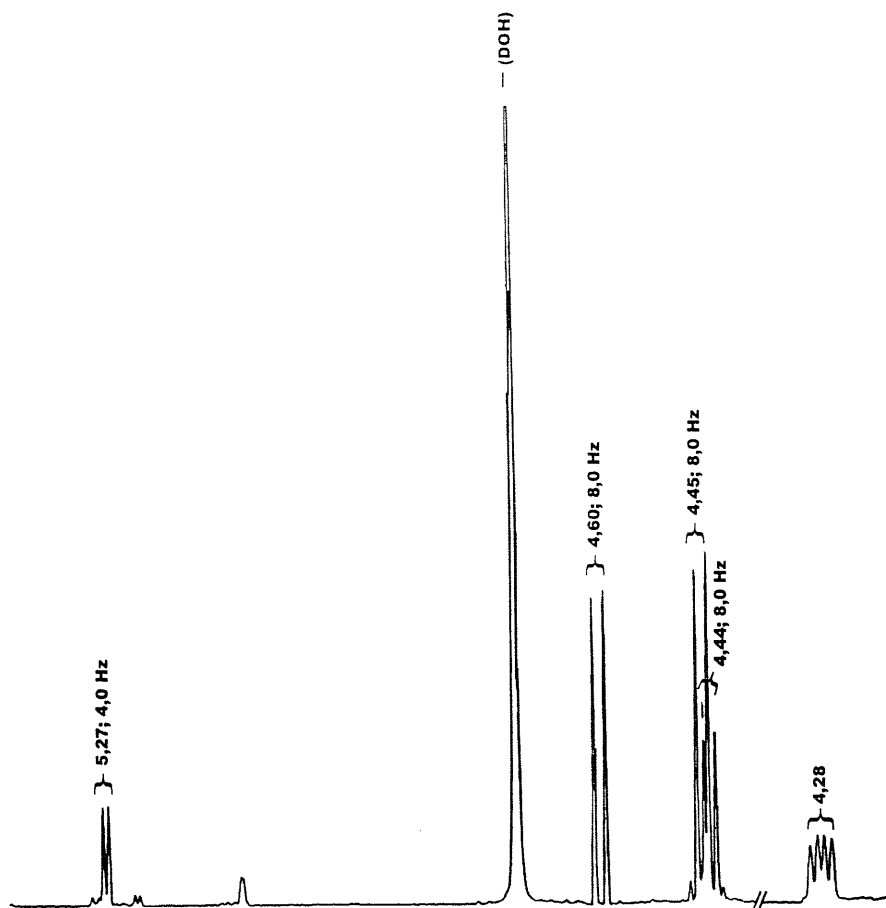


Figura 11: Região de H-1, do espectro de RMN- ^1H (500 MHz) da fração $F_{0,83}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Utilizando-se do experimento de RMN bidimensional, a espectroscopia de correlação do tipo DQFCOSY, pode-se assinalar os deslocamentos de H-2 (Figura 12). O espectro de 2D de DQFCOSY baseia-se no acoplamento (escalar) homonuclear dos prótons existentes na molécula.

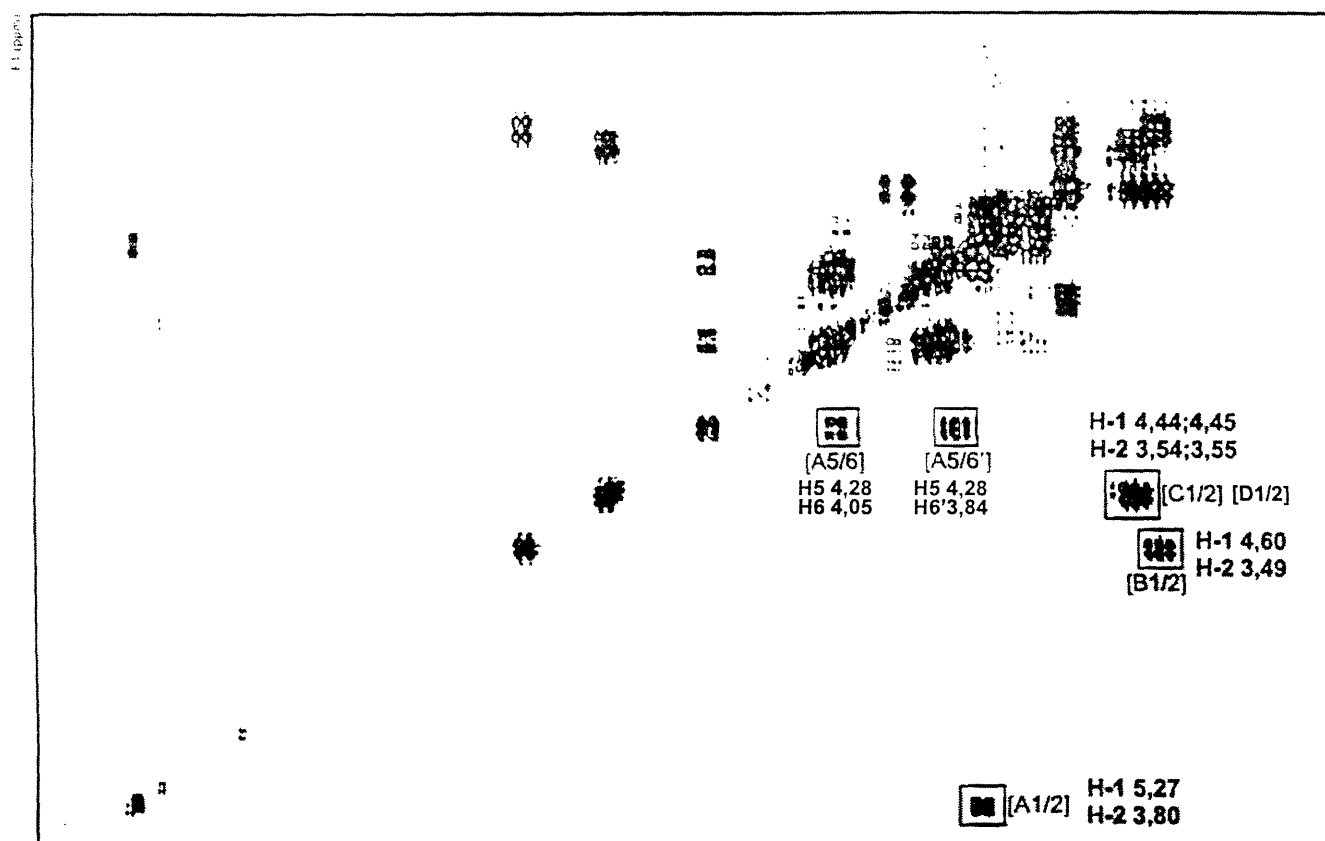


Figura 12: Espectro de RMN de correlação DQFCOSY [^1H - ^1H] da fração $F_{0,83}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. A: α -D-Galp; B: β -D-Galp; C: β -D-Galp-(1 \rightarrow).

Neste espectro, pode-se assinalar 2 prótons acoplados de forma escalar por vez (BYRD *et al.*, 1987) isto é, partindo de H-1 na diagonal central do espectro obtêm-se o assinalamento de H-2 desta unidade, posteriormente de H-3 (quando possível). Em virtude de sobreposições dos sinais, tem-se dificuldade na atribuição dos assinalamentos de H-4, H-5 e H-6.

Para as unidades redutoras de α -D-Galp, partindo-se de H-1 em δ 5,27 (na diagonal central) tem-se o assinalamento em δ 3,80 para H-2, do mesmo modo que para a unidade de β -D-Galp, onde a partir de δ 4,60 obtêm-se o deslocamento para H-2 em δ 3,49. Para unidade não-redutora partindo dos H-1 em δ 4,45 e 4,44, foram assinalados os sinais de H-2 em δ 3,54 e 3,55. Os sinais para H-3 e H-4 não foram assinalados por este espectro devido a sobreposições.

O sinal de H-5 da unidade redutora α -D-Galp foi assinalado em δ 4,28, a partir do espectro de próton de acordo com dados da literatura (JONES, c., 1994). Os sinais de H-5 aparecem como quadruplete, em virtude do acoplamento com os sinais de H-6. A partir do assinalamento de H-5 (δ 4,28) da unidade redutora α -D-Galp, foi possível determinar os assinalamentos de H-6 e H-6', em δ 4,05 e 3,84, respectivamente. Estas correlações estão mostrados no espectro.

Os assinalamentos para os sinais de prótons foram confirmados e assinalados, a partir dos valores já conhecidos das ressonâncias de ^{13}C , por outro experimento de correlação de RMN bidimensional HMQC, mostrado na Figura 13.

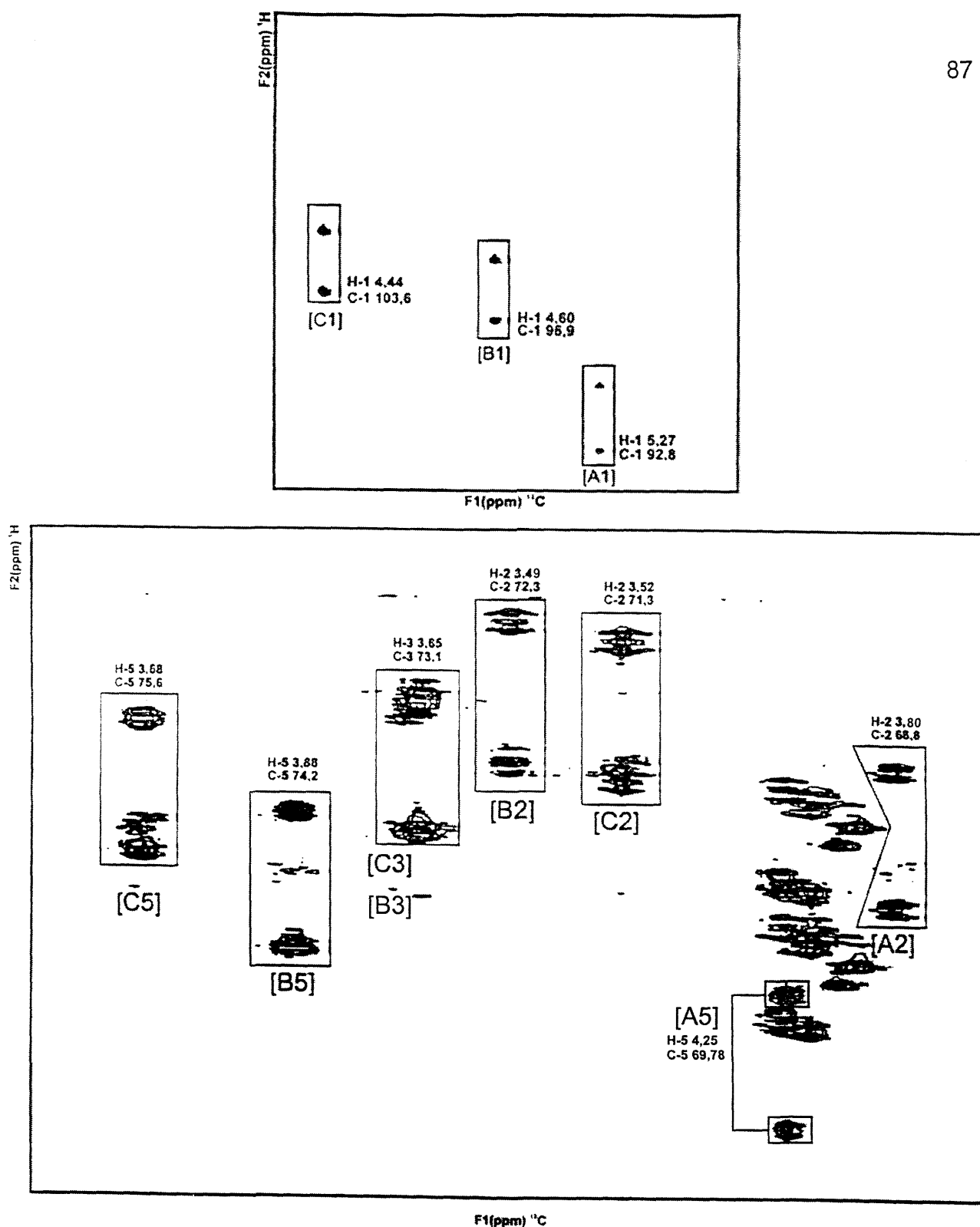


Figura 13: Espectro de RMN de correlação HMQC [^1H - ^{13}C] da fração $F_{0,83}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. A: α -D-Galp; B: β -D-Galp; C: β -D-Galp-(1 \rightarrow).

O método HMQC fundamenta-se no acoplamento escalar existente entre hidrogênio diretamente ligado ao carbono. Os picos de correlação verificados indicam os hidrogênios (eixo vertical-abcissas) e carbonos (eixo horizontal-ordenadas) correspondentes. Os deslocamentos dos prótons correspondem a média dos dupletes.

Para as unidades redutoras, o deslocamento químico para α -D-galactose, em δ 92,8, para C-1, relaciona-se com o deslocamento para H-1 em δ 5,27, e para β -D-galactose, em δ 96,9 (C-1), correlaciona-se com o sinal em δ 4,60 (H-1). O deslocamento químico em δ 103,6, correspondente ao C1 da unidade de β -D-galactose não-redutora, correlaciona-se com o assinalamento de H-1 em δ 4,44.

Em outra região ampliada do espectro de HMQC, foram correlacionados os seguintes sinais, para unidade não redutora de β -D-Galp, em δ 71,3 (C-2) para δ 3,52 (H-2), em δ 73,1 (C-3) para 3,65 (H-3), em δ 75,6 (C-5) para δ 3,68 (H-5).

Para unidade redutora de β -D-Galp, as correlações entre os sinais em δ 72,3 (C-2) para δ 3,48 (H-2), em δ 73,1 (C-3) para δ 3,65 (H-3), em δ 74,2 (C-5) para δ 3,88 (H-5). Tem-se sobreposição dos sinais do C-3 da unidade β -galactose não redutora e redutora, como foi apresentado no espectro de ^{13}C , os sinais próximos em δ 73,15 e 73,11, para as respectivas unidades.

Para a unidade α -D-Galp, correlacionou-se o sinal em δ 68,8 (C-2) com o sinal em δ 3,79 (H-2). Além disso, a partir do sinal em δ 4,25 (H-5) obteve-se o sinal em δ 68,78 para o C-5. As correlações estão mostradas no espectro (Figura 13).

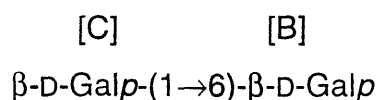
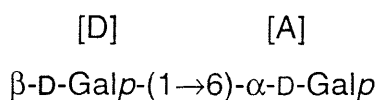
Não foi possível obter, em virtude das sobreposições, as correlações de C-

4/H-4 para unidade de β -galactose não redutora, as de C-4/H-4 e de C-6/H-6 para unidade redutora. E para unidade redutora de α -galactose as correlações de C-3/H-3, C-4/H-4 e C-6/H-6.

De acordo com os assinalamentos obtidos por RMN da fração $F_{0,83}$, concluiu-se sua estrutura como sendo um dissacarídeo: β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp.

Na Tabela V, estão relacionados os assinalamentos para fração $F_{0,83}$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H 1D e 2D.

Tabela V: Assinalamentos (em δ ppm) da fração $F_{0,83}$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H .



Unidades		H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6	H6'
[A]	$\rightarrow 6)$ - α -D-Galp	5,27	3,80			4,28	4,05	3,84
		92,8	68,8	69,73 ou 69,4	69,73 ou 69,4	69,78	69,81	
[B]	$\rightarrow 6)$ - β -D-Galp	4,60	3,49	3,65		3,88		
		96,9	72,3	73,11	69,3	74,2	69,54	
[C]	β -D-Galp-(1 \rightarrow	4,45	3,53	3,65		3,68		
		103,6	71,3	73,15	69,1	75,6	61,5	
[D]	β -D-Galp-(1 \rightarrow	4,44	3,55					
		103,7						

A fração $F_{0,82}$ foi analisada por espectrometria de massa - ESI-MS (modo negativo), obtendo-se, como mostrado no espectro (Figura 14), o pico do íon molecular de massa 341,2 m/z, correspondente à m/z de duas unidades de hexoses e um pico com massa de 179 m/z, corresponde a uma unidade de hexose (- 1 hidrogênio). A partir deste espectro pode-se mostrar também a pureza desta fração e a presença de um dissacarídeo, confirmando os dados obtidos na análise em HPLC e das análises de RMN.

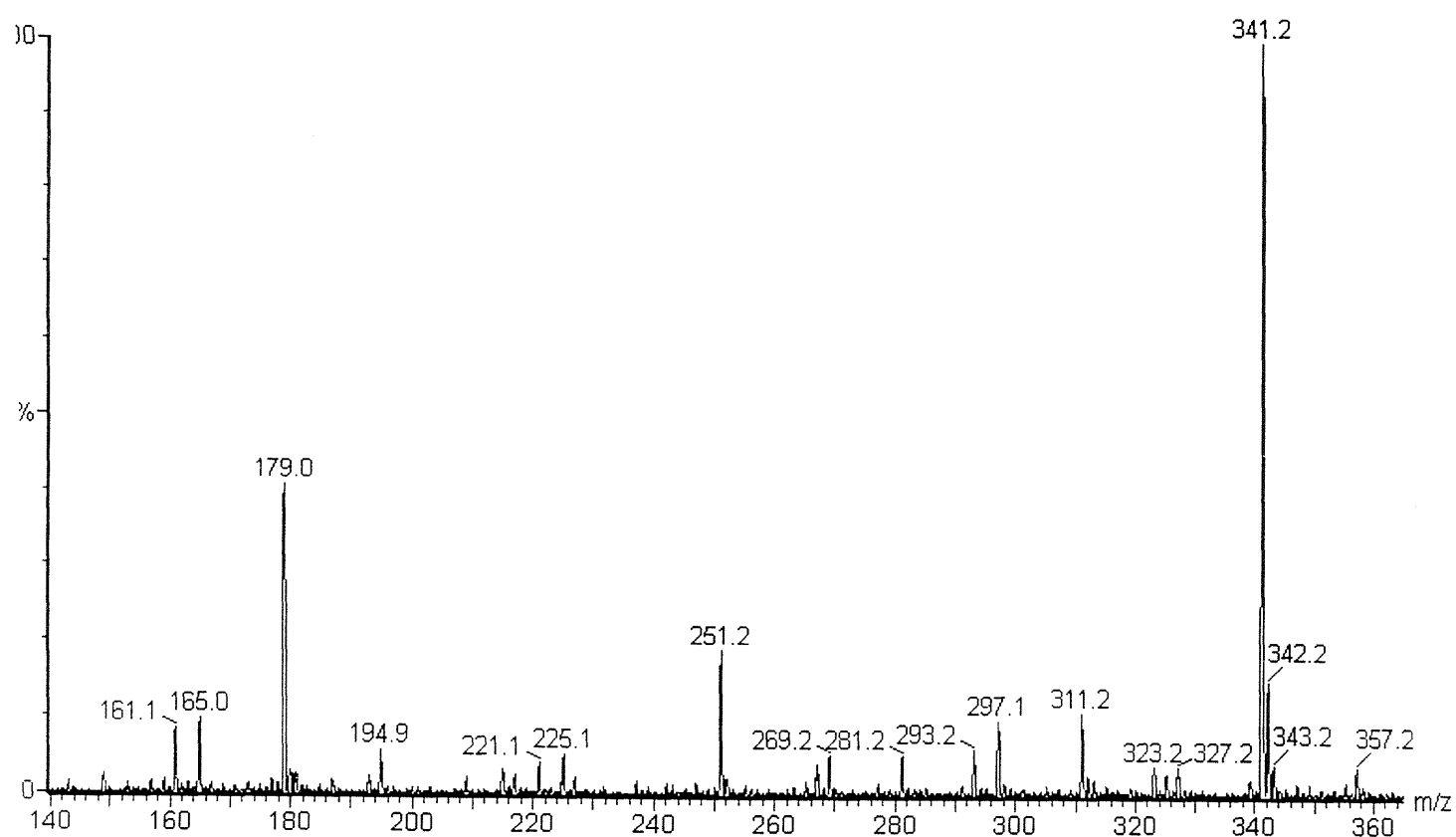


Figura 14: Espectro de espectrometria de massa - ESI-MS da fração F_{0.83}.

A partir dos resultados obtidos para a fração $F_{0,82}$, concluiu-se que esta fração corresponde ao dissacarídeo β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp-, sendo idêntica a fração $F_{0,83}$, em virtude de apresentar:

- 1) A galactose como monossacarídeo constituinte;
- 2) R_{lact} próximos ou idênticos, calculados em diferentes solventes;
- 3) Um perfil semelhante em HPLC, com um pico principal com tempo de retenção em 31,3 minutos, correspondendo a 90% da amostra total;
- 4) Um espectro de RMN- ^1H idêntico, mostrando na região de próton anomérico os sinais para as unidades redutoras de α -D-Galp, em δ 5,27 (J 4,0 Hz), e de β -D-Galp, em δ 4,60 (J 8,0 Hz). E para unidade não-redutora os sinais em δ 4,45 (J 8,0 Hz) e 4,44 (J 8,0 Hz).;
- 5) Um espectro de espectrometria de massa - ESI-MS (modo negativo) idêntico, tendo como principais picos de íons massa de 341,2 m/z e 179,0 m/z.

4.1.4 Caracterização estrutural da Fração F_{0,79} e 0.70

O perfil do cromatograma obtido pela análise em HPLC da Fração F_{0,79} e 0.70 na forma 2-aminobenzamida derivado, apresentou dois picos principais, com tempo de retenção (em minutos) em 34,5 e 36,2, correspondendo a 21% e 65%, respectivamente, da fração analisada, como mostrado na Figura 15.

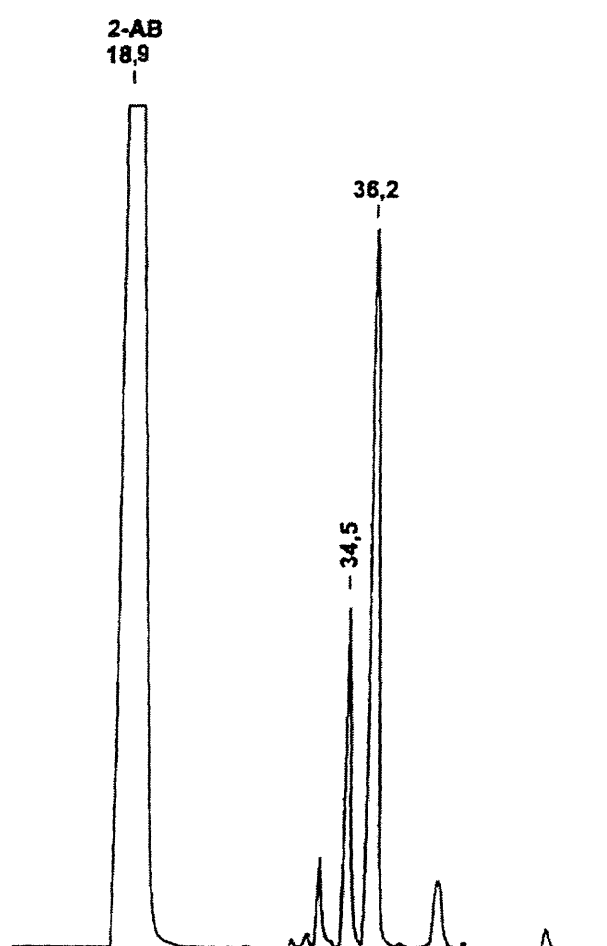


Figura 15: Perfil de eluição* obtido em HPLC da fração F_{0,79} e 0.70 na forma do derivado 2-aminobenzamida.

* tempo de retenção em minutos; 2-AB livre.

A determinação da composição monossacarídica desta fração não foi realizada, em virtude, do seu perfil cromatográfico, o qual apresentou-se como duas manchas em CP e TLC-celulose (solvente *n*-butanol:piridina:água, 1:1:1). Pelos dados obtidos no HPLC e pelos R_{lact} obtidos em CP e TLC celulose, poderia-se afirmar que esta fração era heterogênea.

A análise da fração $F_{0,79}$ e $0,70$, por espectroscopia de RMN- ^{13}C (Figura 16), mostrou um espectro com os maiores sinais idênticos ao do obtido para o dissacarídeo $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\beta\text{-D-GlcpA}$, isolado e caracterizado por DELGOBO *et al.* (1998), a partir do exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina*. A caracterização estrutural deste dissacarídeo foi realizada pela técnica de RMN, utilizando os espectros de ^{13}C , ^1H , COSY, TOCSY, HMQC, ROESY e HMBC e também, a partir dos dados obtidos na caracterização estrutural do trissacarídeo $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ (DELGOBO *et al.*, 1998).

O espectro de RMN- ^{13}C (Figura 16), apresentou na região de C-1, 3 sinais, indicando a presença de um dissacarídeo, em δ 101,1, 96,3 ($>$) e 92,4 ($<$), assinalados para $\alpha\text{-L-Rhap}$, $\beta\text{-D-GlcpA}$ e $\alpha\text{-D-GlcpA}$, respectivamente.

Os sinais em campo mais baixo, da região de C-2 a C-5 foram assinalados para C-4 da unidade redutora de $\alpha\beta\text{-D-GlcpA}$, em δ 80,0 (α , $<$) e em 79,6 (β , $>$), indicando ligação do tipo (1 \rightarrow 4). Para esta unidade, foram assinalados os sinais para o anômero α , em δ 72,0 (C-2), em 71,8 (C-3), em 72,3 (C-5). Para o anômero β , foram assinalados os sinais em δ 74,8 (C-2), em 74,7 (C-3) e em 76,8 (C-5). O sinal em δ 174,4 foi atribuído para COOH (C-6) da unidade de GlcpA, porém não está mostrado no espectro (Figura 16).

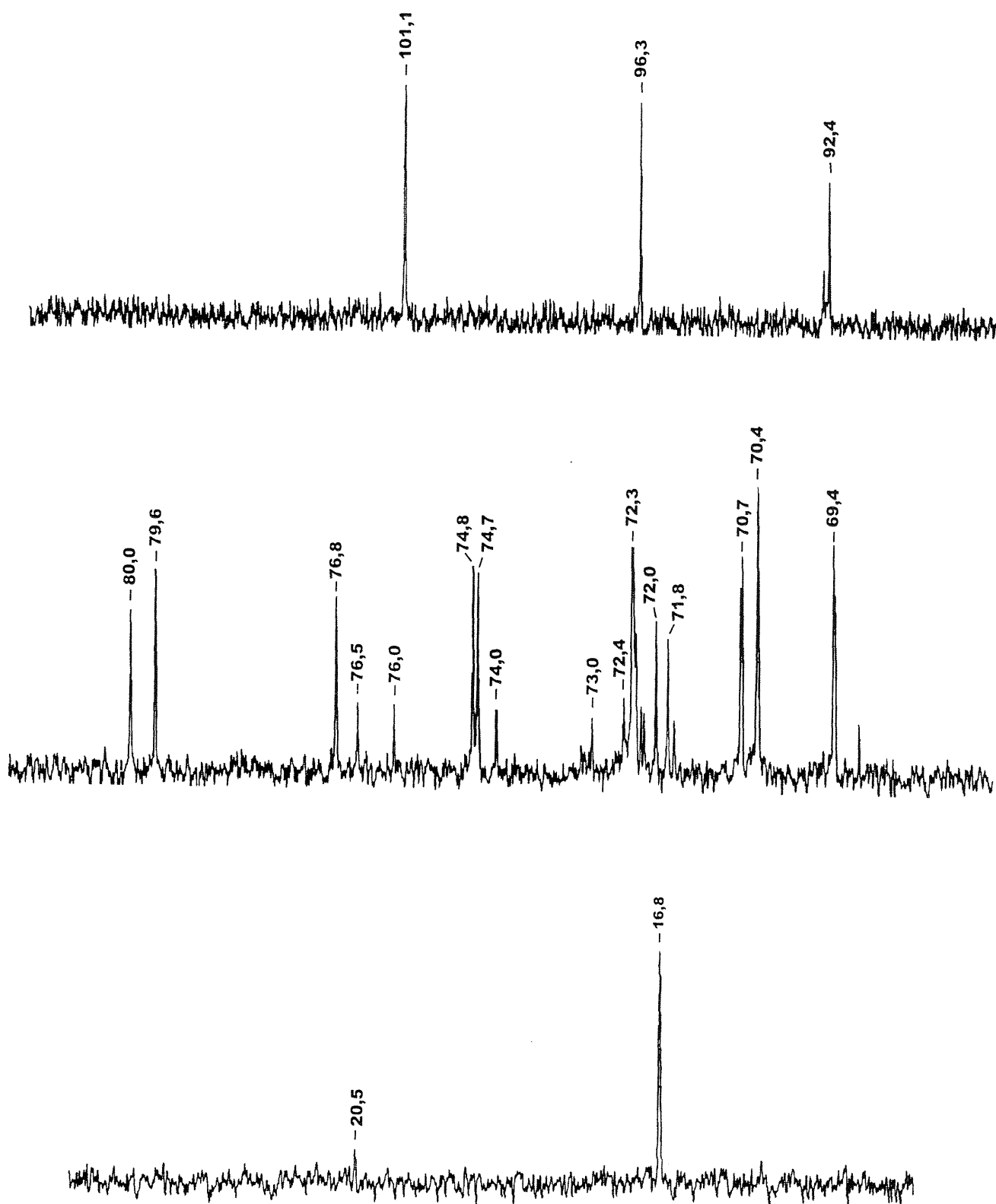


Figura 16: Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz) da fração $F_{0,79}$ e $0,70$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Para unidade terminal de α -L-Rhap foi assinalado, em campo mais alto do espectro, o sinal característico para C-6 (CH₃) em δ 16,8. Os sinais da região de C-2 a C-5 foram assinalados, em δ 70,7 (C-2), 70,4 (C-3), 72,3 (C-4) e em 69,4 (C-5). Tem-se sobreposição dos sinais para de C-4 da ramnose e C-5 da unidade redutora α , também por DELGOBO *et al.* (1998).

O sinal em δ 20,5 corresponde ao grupo metila do AcO⁻, utilizado como padrão interno.

No espectro de RMN-¹³C, observa-se a presença de alguns sinais, com menor intensidade, em δ 76,5; 76,0; 74,4; 73,0; 72,4; 72,2; 72,1; 71,7 e 68,9, os quais não foram assinalados. Estes sinais confirmam, novamente que esta fração não apresentava-se homogênea, como verificado por CP e HPLC. Apesar da heterogeneidade desta fração, foram considerados os sinais com maiores intensidades, para determinar os assinalamentos dos carbonos, das respectivas unidades.

Os deslocamentos dos carbonos foram utilizados para determinar os assinalamentos dos prótons, pelo espectro de correlação do tipo HMQC.

No espectro de RMN-¹H desta fração (Figura 17), observa-se os sinais, de H-1, para as unidades redutoras de D-GlcpA, em δ 5,24 (J 3,2 Hz), para anômero α e em δ 4,64 (J 6,4 Hz), para o anômero β . Para unidade terminal de α -D-Rhap o sinal em δ 4,73 (J 0 Hz). Em campo alto, tem-se o sinal em δ 1,25 (J 5,2 Hz), correspondente ao H-6, desta unidade (não está mostrado no espectro).

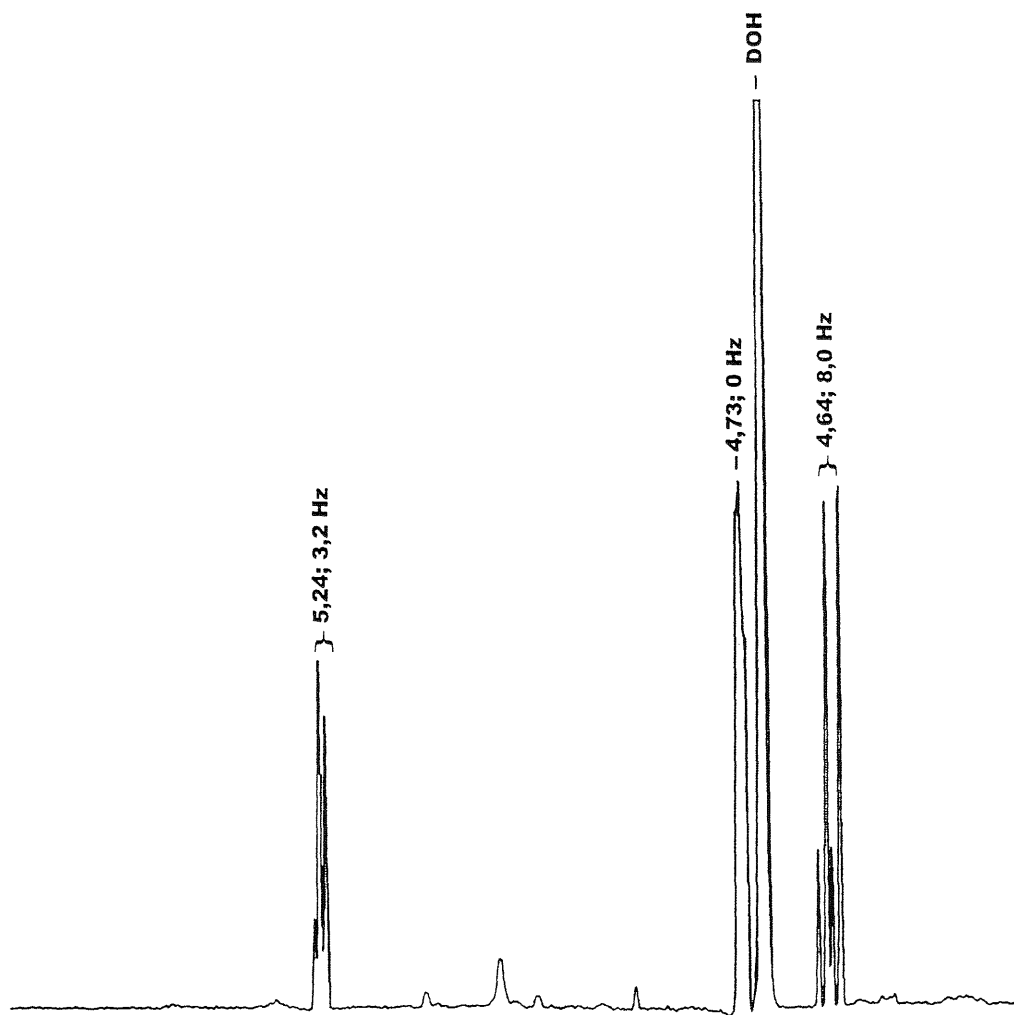


Figura 17: Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (500 MHz) da fração $F_{0,79}$ e $0,70$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

O espectro RMN- ^1H bidimensional de correlação do tipo TNDQFCOSY, (Figura 18), pode-se assinalar os deslocamentos de H-2 das unidades redutoras de α -D-GlcpA, partindo-se de H-1 em δ 5,24 (na diagonal central) tem-se o assinalamento em δ 3,61 para H-2. Por este espectro não foi possível obter os assinalamentos dos outros prótons. Para a unidade de β -D-GlcpA, partindo de δ 4,64 obtêm-se o deslocamento para H-2 em δ 3,31. Tem-se a correlação de H-2 (3,31) com o sinal em δ 3,56 (H-3), e de H-3 (3,56) com o sinal em δ 3,56 (H-4).

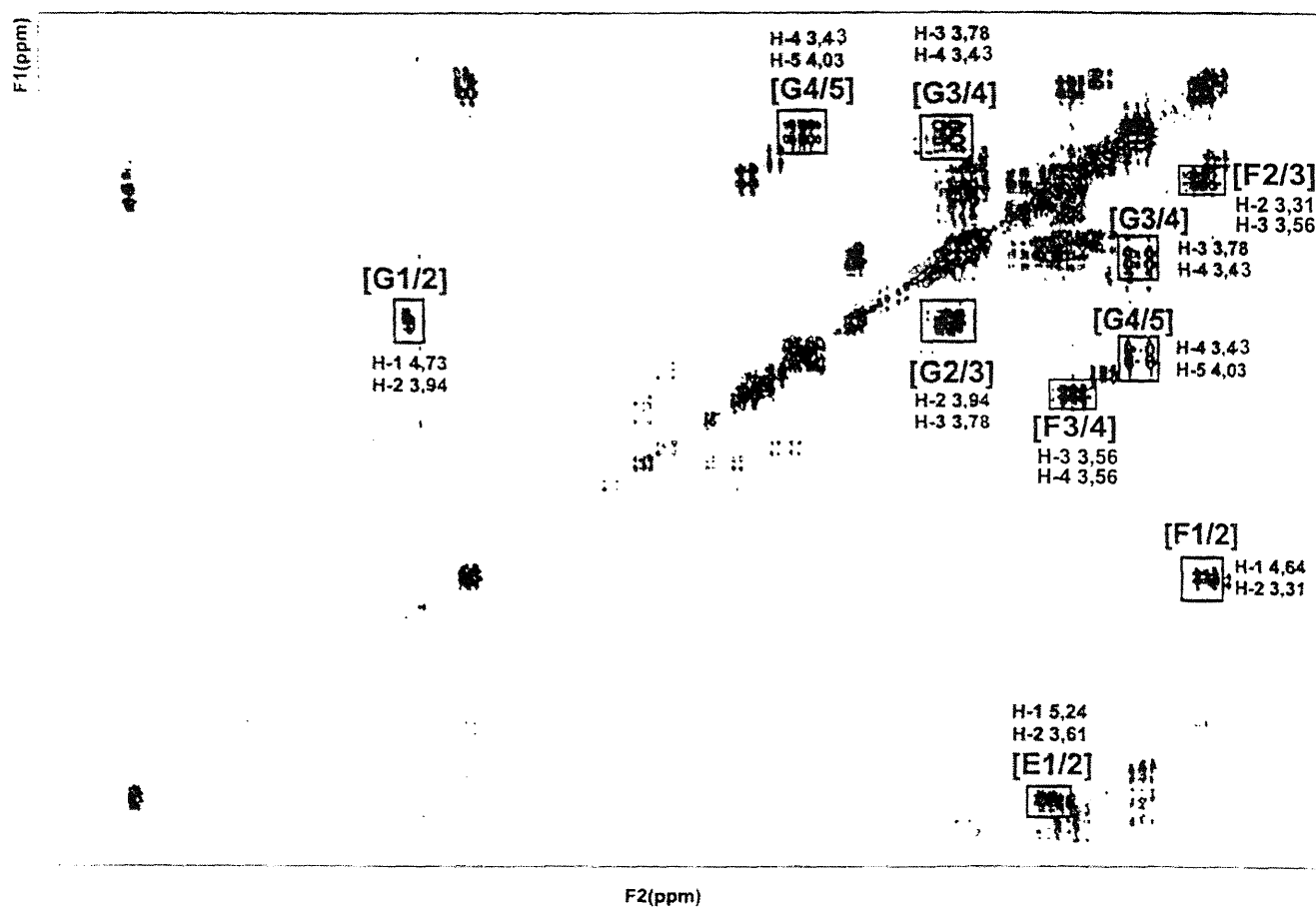


Figura 18: Espectro de RMN de correlação TNDQFCOSY [^1H - ^1H] da fração $\text{F}_{0,79}$ e $\text{F}_{0,70}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. E: α -Glc pA; F: β -Glc pA; G: α -Rhap-(1 \rightarrow).

Para unidade terminal, partindo do H-1 em δ 4,73 tem-se a correlação com H-2 em δ 3,94. Obtendo-se, os deslocamentos para H-3, H-4 e H-5, em δ 3,78, 3,44 e 4,03, respectivamente.

Pelo experimento de RMN de correlação ^1H - ^{13}C bidimensional, HMQC, mostrado na Figura 19, confirmaram-se os deslocamentos até então obtidos, e foram assinalados outros sinais.

Para as unidades redutoras, o deslocamento químico para α -D-GlcpA, em δ 92,4 para C-1, relaciona-se com o deslocamento para H-1 em δ 5,23, e para β -D-GlcpA, em δ 96,3 (C-1), correlaciona-se com o sinal em δ 4,64 (H-1). O deslocamento químico em δ 101,1, correspondente ao C1 da unidade terminal de α -ramnose, correlaciona-se com o assinalamento de H-1 em δ 4,73.

Com outra região ampliada do espectro de HMQC, foram correlacionados os seguintes sinais, para unidade terminal de α -Rhap, em δ 70,7 (C-2) para δ 3,93 (H-2), em δ 70,4 (C-3) para 3,76 (H-3), em δ 72,3 (C-4) para δ 3,43 (H-4), em δ 69,4 (C-5) para δ 4,03 (H-5).

Para unidade redutora de β -D-GlcpA, as correlações entre os sinais em δ 74,8 (C-2) para δ 3,33 (H-2), em δ 74,7 (C-3) para δ 3,56 (H-3), em δ 79,6 (C-4) para δ 3,56 (H-4), em δ 76,8 (C-5) para δ 3,75 (H-5). Tem-se sobreposição dos sinais de H-3 e H-4, como verificado no espectro de TNDQFCOSY.

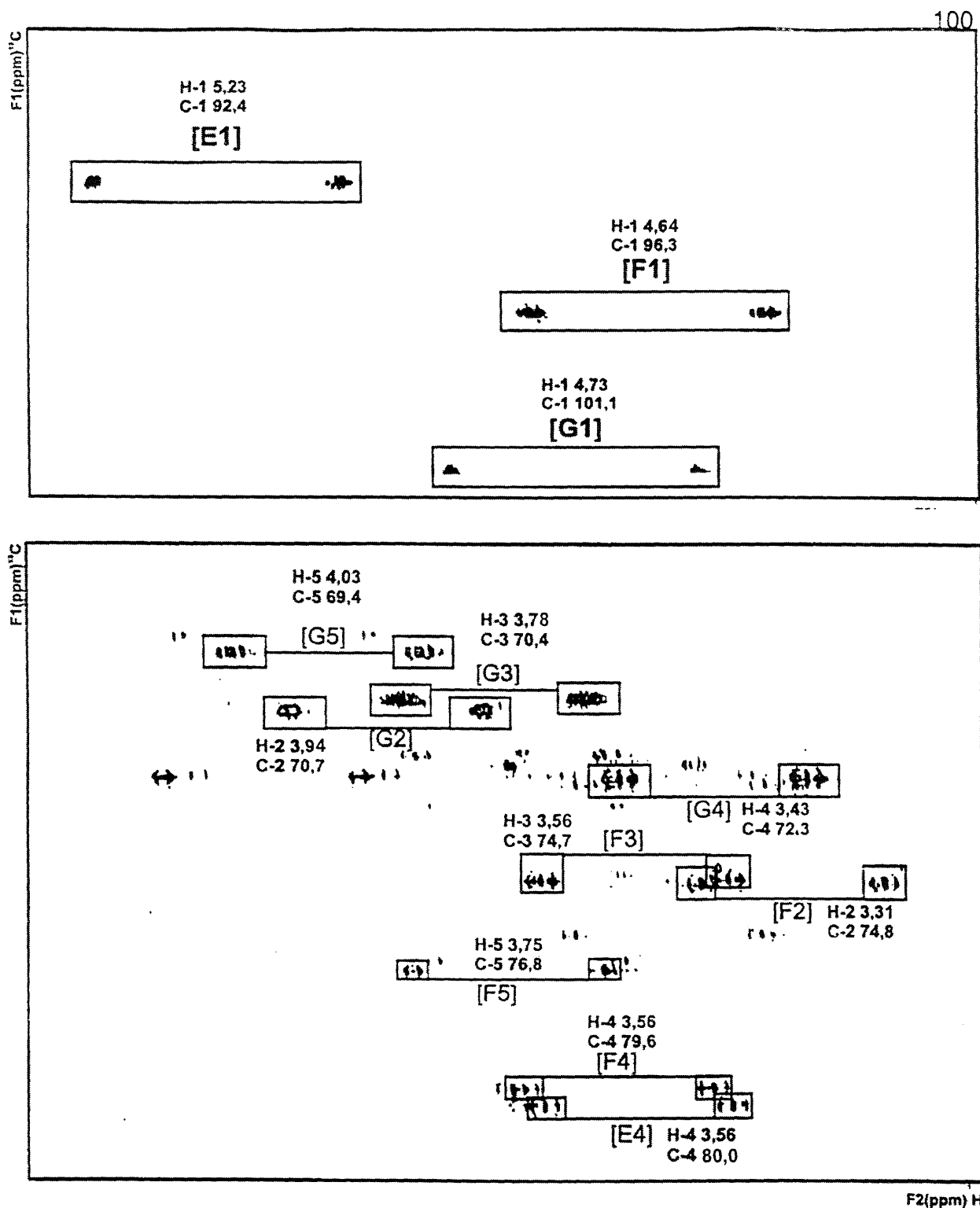


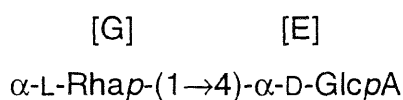
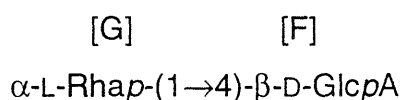
Figura 19: Espectro de RMN de correlação HMQC [^1H - ^{13}C] da fração $F_{0,79}$ e $0,70$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. E: α -Glc pA; F: β -Glc pA; G: α -Rhap-(1 \rightarrow).

Para a unidade α -D-GlcpA, correlacionou-se apenas o sinal do carbono O-substituído (C-4), em δ 79,9 (C-4) para δ 3,56 (H-4). Esses assinalamentos mostram, que tem-se o mesmo deslocamento para o H-4 das unidades de $\alpha\beta$ -GlcpA (δ 3,56). A similariedade dos deslocamentos de H-4 para a unidade redutora de ácido glucucurônico também foi verificada por DELGOBO *et al.* (1998), porém o valor atribuído foi de δ 3,58. Os resultados dos experimentos de ROESY e HMBC realizados por DELGOBO *et al.* (1998), contribuíram para confirmação da ligação do tipo (1 \rightarrow 4), em virtude, da correlação entre o H-1 da ramnose com C-4 do ácido glucurônico, mostrada no espectro de HMBC.

De acordo com os assinalamentos obtidos por RMN da fração F_{0,79} e 0,70, concluiu-se sua estrutura como sendo um dissacarídeo: α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-GlcpA. Na Tabela VI, estão relacionados os assinalamentos para fração F_{0,83} obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H 1D e 2D.

Tabela VI: Assinalamentos (δ ppm) da fração F_{0,79 e 0,70} obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H



Unidades		H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6	H6'
[G]	$\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$	4,73	3,94	3,78	3,44	4,03	1,25	
		101,1	70,7	70,4	72,3	69,4	16,8	
[E]	$\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-GlcpA}$	5,24	3,61		3,56			
		92,4	72,0	71,8	80,0	72,3		
[F]	$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpA}$	4,62	3,31	3,56	3,56	3,75		
		96,3	74,8	74,7	74,6	76,8		

A fração F_{0,79 e 0,70} foi analisada por espectrometria de massa - ESI-MS (modo negativo), obtendo-se, como mostrado no espectro (Figura 20), um pico principal do íon negativo molecular de massa 339,2 m/z, correspondente à m/z de a uma unidade de ácido urônico e uma unidade de hexose. Neste espectro tem-se também o pico com massa de 193,0 m/z, correspondendo a uma unidade de ácido urônico (-1 hidrogênio) e um pico de íon de massa 163,0 m/z, da unidade de ramnose. Por esta técnica pode-se confirmar a presença do ácido urônico nesta amostra. A massa molecular obtida pelo espectro de ESI-MS, confirma os dados das análises de RMN, para o dissacarídeo $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\beta\text{-D-GlcpA}$.

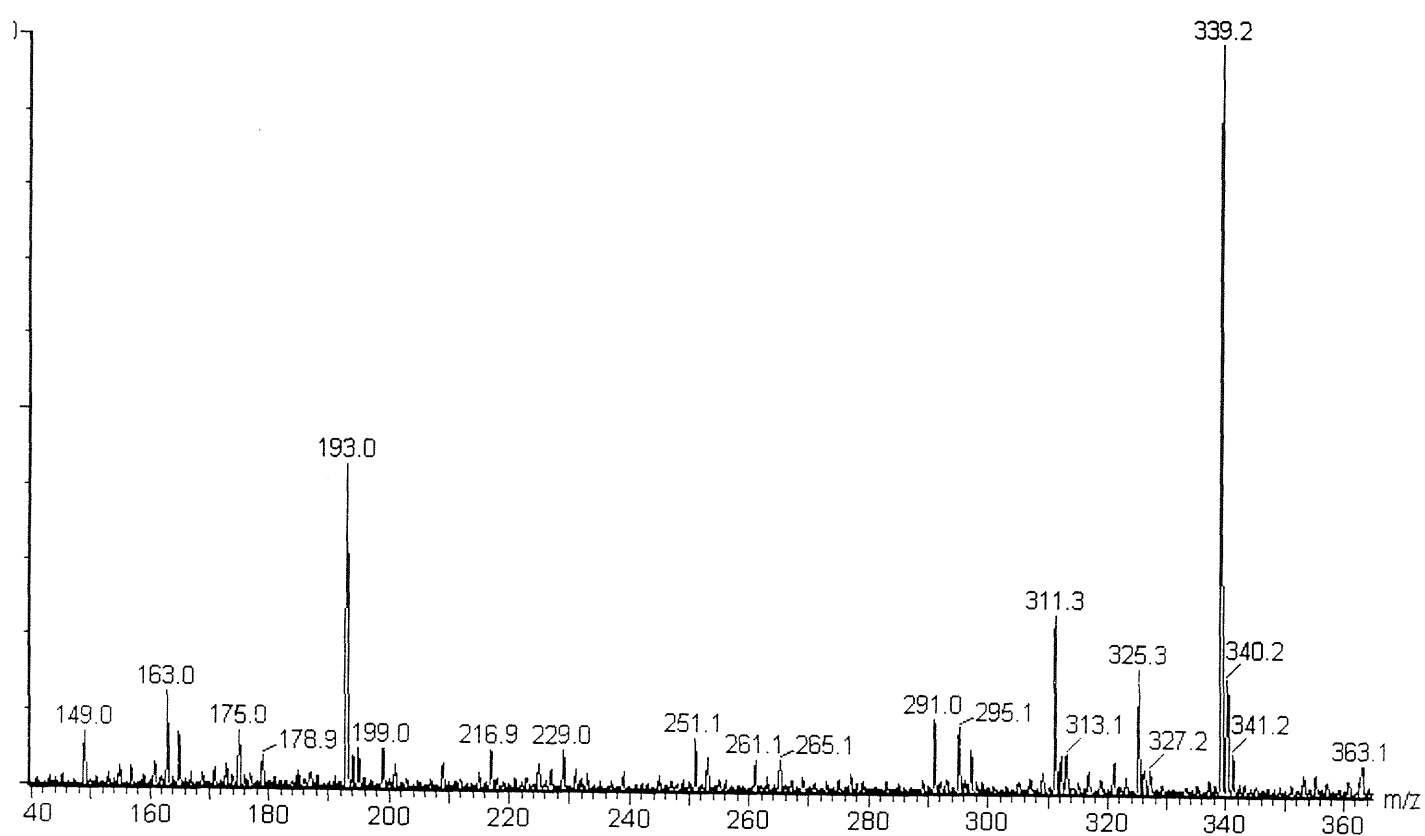


Figura 20: Espectro de espectrometria de massa - ESI-MS da fração $F_{0,79}$ e $0,70$.

4.1.5 Caracterização estrutural da Fração F_{0,50}

O perfil do cromatograma obtido pela análise em HPLC da fração F_{0,50} na forma aminobenzamida derivada, apresentou dois picos principais, correspondendo a 63% e 22% da fração analisada, com tempo de retenção em minutos de 29,1 e 35,3, respectivamente, como mostrado na Figura 21.

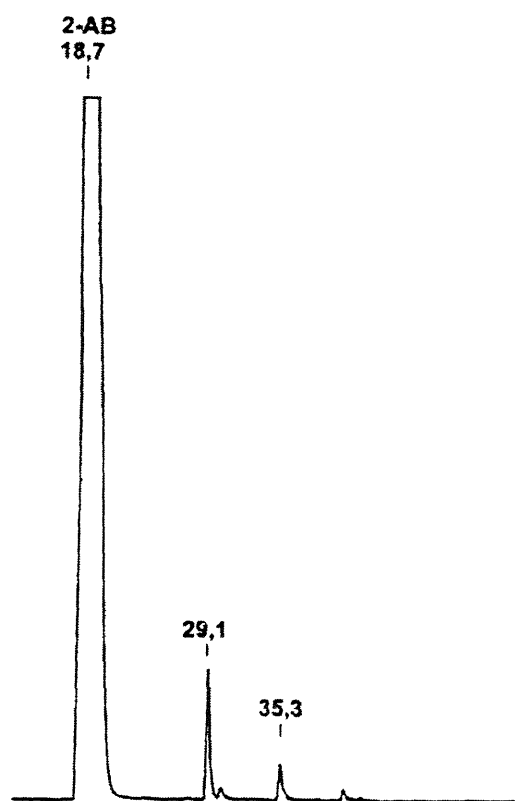


Figura 21: Perfil de eluição* obtido em HPLC da fração F_{0,50} na forma do derivado 2-aminobenzamida.

* tempo de retenção em minutos; 2-AB livre.

Pelos dados obtidos em HPLC poderia-se supor que esta fração era heterogênea. A determinação da composição monossacarídica desta fração, mostrou como principal monossacarídeo constituinte a galactose (CG-EM e CP),

porém, por CP (solvente *n*-butanol:piridina:água, 1:1:1), visualizou-se a presença de ácido aldobiurônico e ácido urônico (mesmo *R_f* do padrão de ácido galacturônico).

A análise da fração $F_{0,50}$, por espectroscopia de RMN ^{13}C (Figura 22), mostrou um espectro com baixa resolução, apresentando na região de C-1, como principais sinais, os deslocamentos em δ 92,8, 96,8, 101,1, 102,8. Além disso, observa-se sobreposição de vários sinais na região de δ 103,5 a 103,8, sugerindo que esta fração poderia ser uma mistura.

Porém, em relação ao espectro de RMN- ^{13}C , ressaltando aos sinais observados em δ 92,8 (<), 96,8 (>), 101,1, 103,0, estes foram atribuídos as unidades de α -D-Galp, β -D-Galp, α -L-Rhap, β -D-GlcAp, respectivamente. A padronização dos deslocamentos para a unidade de D-galactose redutora foi feita de acordo com GORIN & MAZUREK (1975) e DELGOBO *et al.* (1998), sendo δ 92,9 e 96,8, para os anômeros α e β , respectivamente. Para os assinalamentos das unidades de ramnose e ácido glucurônico utilizou-se os deslocamentos obtidos da fração $F_{0,79}$ e $0,70$ e os citados por DELGOBO *et al.* (1998).

Com relação aos sinais em campo mais alto foram assinalados para unidade terminal de α -L-Rhap o deslocamento característico para C-6 (CH_3) em δ 16,9, além dos sinais, em δ 70,7 (C-2), em 70,5 (C-3), em 72,4 (C-4), e em 69,4 (C-5).

Para unidade de β -D-GlcAp foi assinalado um pequeno sinal em δ 79,7 correspondendo ao C-4 substituído. O sinal em δ 20,5 corresponde ao grupo metila do AcO^- , utilizado como padrão interno.

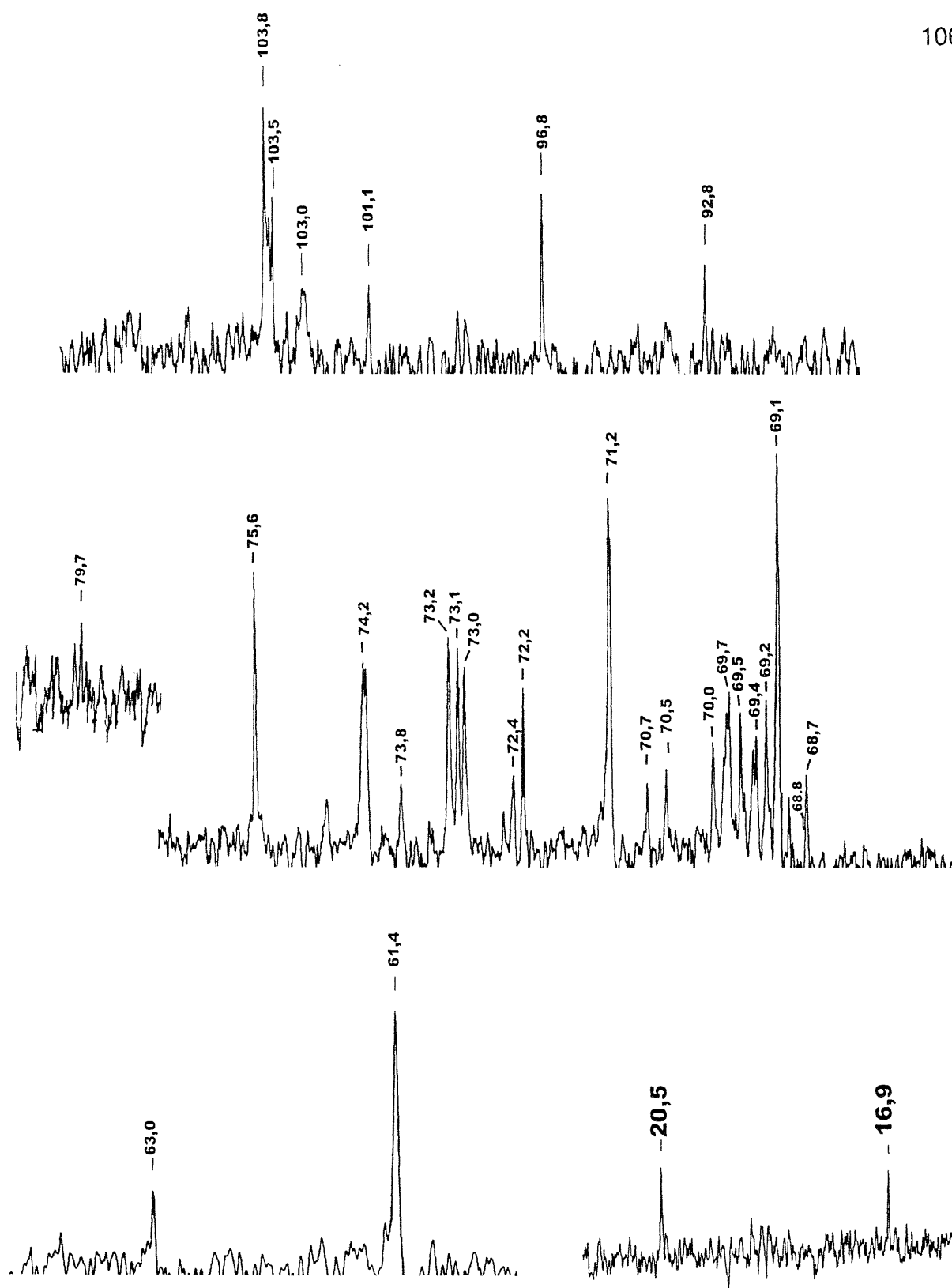


Figura 22: Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz) da fração $F_{0,50}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

No espectro de RMN- ^1H (Figura 23), observa-se, dentre outros sinais, os assinalamentos para H-1, das unidades redutoras de $\alpha\text{-D-Galp}$, em δ 5,27 (J 3,2 Hz), e de $\beta\text{-D-Galp}$, em δ 4,60 (J 6,4 Hz). Para as unidades de $\beta\text{-D-GlcpA}$ o sinal em δ 4,50 (J 6,4 Hz) e para unidade terminal de $\alpha\text{-L-Rhap}$ os sinais em δ 4,74 (J 0 Hz). Os valores de H-2 foram assinalados pelo espectro bidimensional de correlação do tipo de TNDQFCOSY, obtendo-se para as unidades redutoras de $\alpha\beta\text{-D-Galp}$ os sinais em δ 3,80 e 3,49, respectivamente. Para as unidades de $\beta\text{-D-GlcpA}$ e $\alpha\text{-L-Rhap}$ foram obtidos os deslocamentos de H-2, em δ 3,36 e 3,92, respectivamente.

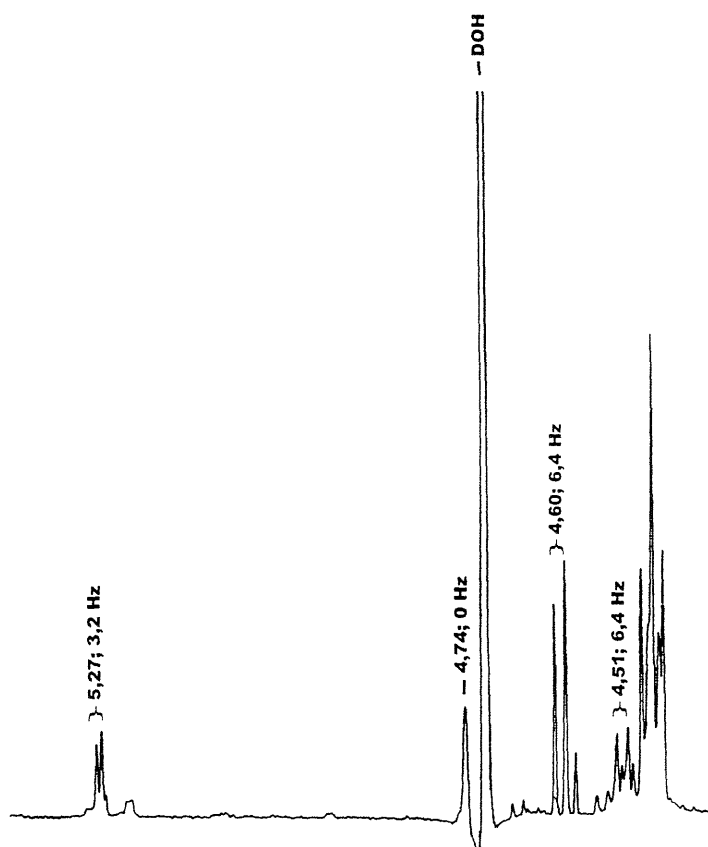
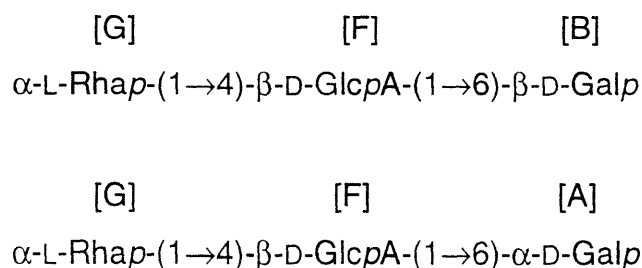


Figura 23: Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (500 MHz) da fração $F_{0,50}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Na Tabela VII, estão relacionados os assinalamentos obtidos para fração $F_{0,50}$ pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H 1D e 2D.

Tabela VII: Assinalamentos (em δ ppm) da fração $F_{0,50}$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H



Unidades		H1/C1	H2/C2	C3	C4	C5	H6/C6	H6'
[G]	$\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$	4,74	3,94				1,25	
		101,1	70,7	70,5	72,4	69,4	16,9	
[F]	$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow$	4,51	3,36		79,7			
		103,0						
[B]	$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp}$	4,60	3,49					
		96,8						
[A]	$\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Galp}$	5,27	3,80					
		92,8						

Pelos espectros de RMN realizados, pode-se sugerir que nesta fração apresenta um trissacarídeo semelhante ao obtido por DELGOBO *et al.*, (1998), caracterizado como $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpA-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$, o qual foi isolado a partir do exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina*. Além disso, pela presença dos sinais de C-1 na região de δ 103,5 a 103,8, e de sobreposições de sinais na região dos C-1 de galactose redutora, sugere-se a presença de um

trissacarídeo de β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp.

A espectrometria de massa - ESI-MS (modo negativo), foi utilizada como estratégia para verificar a pureza desta fração e obtenção dos picos de massa para identificação dos trissacarídeos α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA- $\alpha\beta$ -D-Galp e β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp. O resultado obtido pelo espectro de massa (Figura 24), comprovou a heterogeneidade da fração. Este espectro mostrou o pico de íon negativo molecular de massa 501,2 m/z, correspondente a duas unidades de hexose e uma unidade de ácido urônico, além de picos de fragmentação de massa de 339,2 m/z, 195,0 m/z e 165,0 m/z, correspondentes, a um dissacarídeo (α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-GlcA), a unidade de ácido urônico e de ramnose, respectivamente. Um pico de íon negativo molecular de massa 503,3 m/z seria correspondente ao trissacarídeo de galactose.

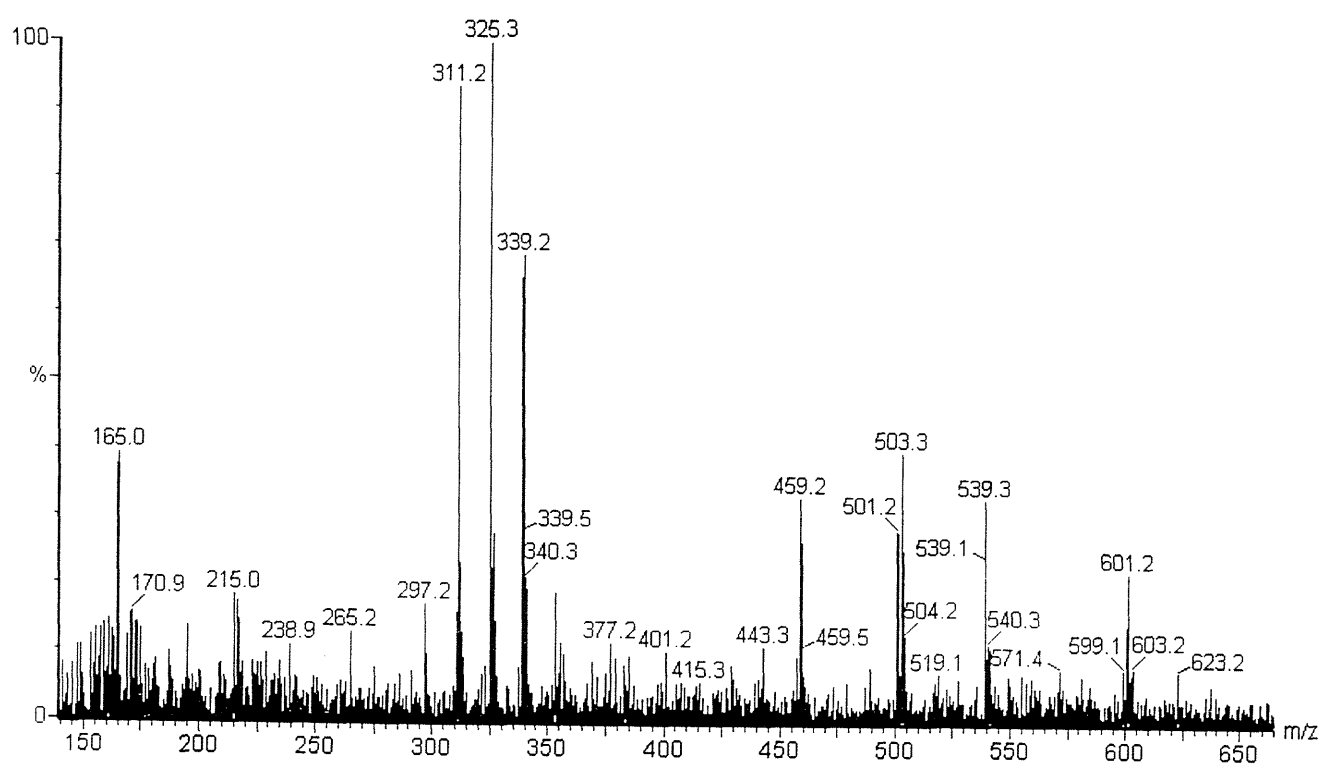


Figura 24: Espectro de espectrometria de massa - ESI-MS da fração $F_{0,50}$.

4.1.6 Caracterização estrutural da Fração F_{0,32}

O perfil do cromatograma obtido pela análise em HPLC da Fração F_{0,32} na forma 2-aminobenzamida derivada, apresentou um pico principal, com tempo de retenção em 37,3, correspondendo a 80%, da fração analisada, como mostrado na Figura 25.

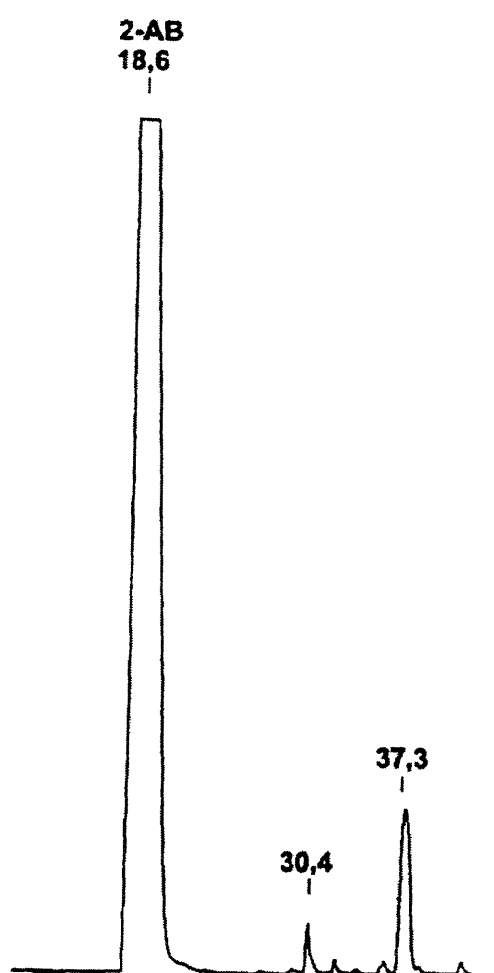


Figura 25: Perfil de eluição* obtido em HPLC da fração F_{0,32} na forma do derivado 2-aminobenzamida.

* tempo de retenção em minutos; 2-AB livre.

Os resultados sobre a determinação da composição monossacarídica, mostraram, a presença de galactose, além de arabinose e ácido urônico. Foi verificada a presença de traços de ramnose e glucose.

A análise da fração $F_{0,32}$, por espectroscopia de RMN- ^{13}C (Figura 26), mostrou na região de C-1, 6 sinais principais. Os assinalamentos foram baseados no trissacarídeo $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glc}p\text{A-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$, isolado por DELGOBO *et al.* (1998), a partir do exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina* e nos dados de GORIN & MAZUREK (1975).

O espectro de RMN- ^{13}C , apresentou na região de C-1, 6 sinais em δ 103,7 e 103,6 ($>$) assinalados para $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$, em 103,0 para $\beta\text{-D-Glc}p\text{A}$, em 101,1 para $\alpha\text{-L-Rhap}$, e em 96,8 ($>$) e 92,8 ($<$), para as unidades de β e $\alpha\text{-D-Galp}$, respectivamente. No espectro também verifica-se um pequeno sinal em δ 92,7, sugerindo a presença de α -galactose ou α -lucose contaminante nesta fração. A unidade $\beta\text{-D-Galp}$ (não redutora), apresenta dois sinais (em δ 103,7 e 103,6), que são influenciados pela unidade redutora de galactose α e β , respectivamente. Este efeito também foi observado na fração $F_{0,83}$. Além disso, estão ausentes sinais de C-3 ou C-4 de galactose substituída. Esses assinalamentos sugerem um tetrassacarídeo como: $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glc}Ap\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$.

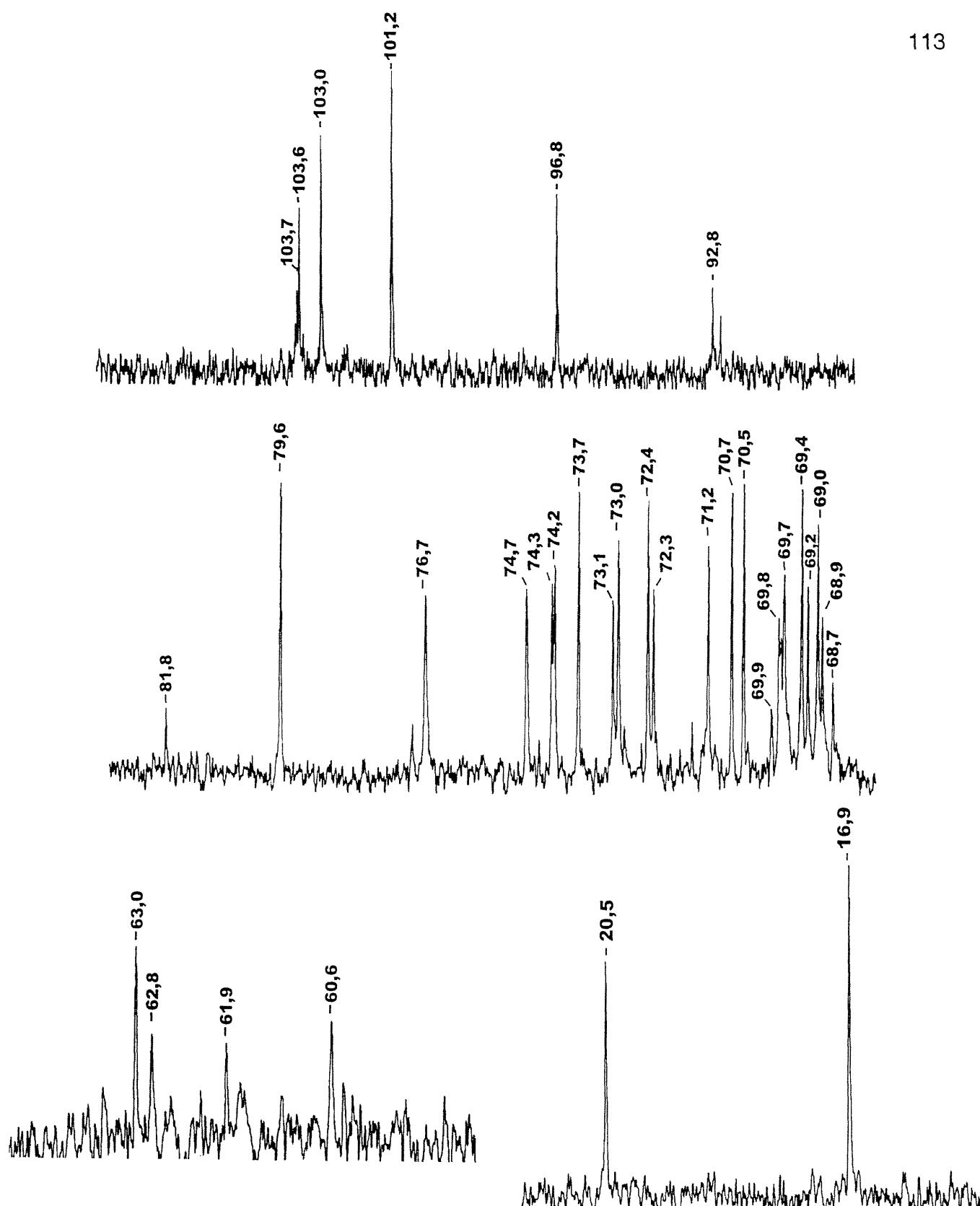


Figura 26: Espectro de RMN - ^{13}C (125 MHz) da fração $F_{0,32}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Com relação aos outros sinais do espectro, foi possível assinalar para a unidade terminal de α -L-Rhap, em campo mais alto, o sinal característico para C-6 (CH_3) em δ 16,9. Além dos sinais, em δ 70,7 (C-2), em 70,5 (C-3), em 72,4 (C-4), e em 69,4 (C-5). Os assinalamentos para esta unidades foram baseados nos resultados de DELGOBO *et al.* (1998) e nos assinalamentos obtidos para as frações $F_{0,79}$ e $F_{0,70}$ e $F_{0,50}$, anteriormente descritas.

Para a unidade de β -D-GlcpA, foram assinalados os deslocamentos em δ 79,6 para C-4 *O*-substituído, e em 73,7, 74,7 e 76,7 para C-2, C-3 e C-5, respectivamente. Além, do sinal pequeno para C-6 em δ 174,6 (não mostrado no espectro).

Para unidade de β -D-galactose, foram determinados os sinais em δ 71,2 para C-2, em 73,0 para C-3, e em 69,0 para C-4. Na região de C-6 livre apresenta-se os sinais em δ 63,0, 62,8, em 61,9 e em 60,6. Para fração $F_{0,83}$, obteve-se um deslocamento para C-6 livre da galactose (não redutora) de 61,5.

Para unidade de galactose redutora, anômero β , foram assinalados os sinais em δ 72,3 para C-2, em 73,1 para C-3 e 74,2 para C-5. E em δ 69,9 para o C-6, o qual sofreu um deslocamento para campo mais baixo, mostrando a presença de ligação do tipo (1 \rightarrow 6) (ADINOLFI *et al.*, 1991). Tem-se sobreposição dos sinais para C-4 das unidades de β -galactose não redutora e redutora, o que foi verificado também para a fração $F_{0,83}$. Para o anômero α , foram assinalados os sinais em δ 68,7 para C-2. Os assinalamentos para C-3, C-4, C-5 e C-6 não foram assinalados, em virtude de sobreposição de sinais. Na fração $F_{0,83}$, foram assinalados para C-5 e C-6, os sinais em δ 69,78 e 69,81 e para os carbonos 3 e

4 não definiu-se os seus respectivos sinais.

O sinal em δ 20,5 corresponde ao grupo metila do AcO^- , utilizado como padrão interno.

No espectro de RMN- ^1H desta fração (Figura 27), observa-se os sinais, de H-1, para as unidades redutoras de α -D-Galp, em δ 5,27 (J 3,2 Hz), e de β -D-Galp, em δ 4,60 (J 6,4 Hz). Para a unidade não redutora de β -D-Galp, observa-se os sinais em δ 4,44 e 4,43 (J 6,4 Hz). Para unidade de β -D-GlcpA, o sinal em δ 4,51 (J 6,4 Hz) e para unidade terminal de α -L-Rhap o sinal em δ 4,74 (J 0 Hz). Além disso, tem-se um sinal, em campo alto, em δ 1,25 (J 5,2 Hz), correspondente ao H-6, desta unidade e na região de H-1, o sinal em δ 5,41, correspondendo ao protón anomérico de uma unidade de α -D-galactose ou α -D-glucose contaminante, porém não estão mostrados no espectro.

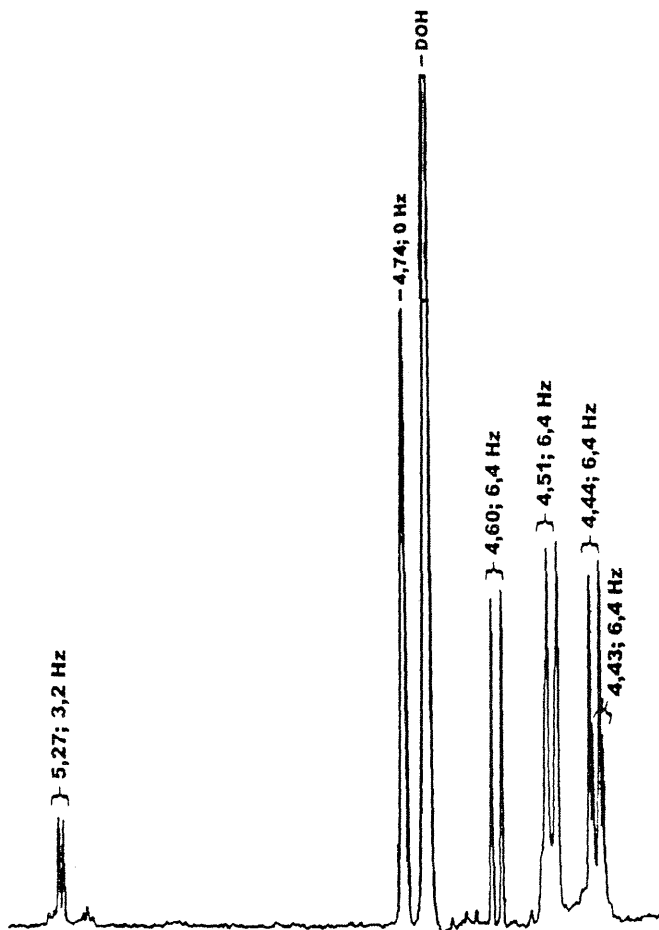


Figura 27: Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (500 MHz) da fração $F_{0,32}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Através do espectro RMN- ^1H bidimensional de correlação do tipo TNDQFCOSY, (Figura 28), pode-se assinalar para a unidade redutora de D-Galp, anomero α , os assinalamentos em δ 3,81 para H-2, em 3,87 para H-3, em 4,28 para H-5, em 4,04 para H-6 e em 3,84 para H-6'. Devido a sobreposição de sinais não foi possível identificar o sinal para H-4 (na Figura 28 estão identificadas as respectivas correlações). Para o anomero β , obtêm-se o deslocamento para H-2 em δ 3,49. Para unidade não redutora de β -D-galactose, partindo do H-1 em δ 4,44 ppm tem-se a correlação com H-2 em δ 3,53.

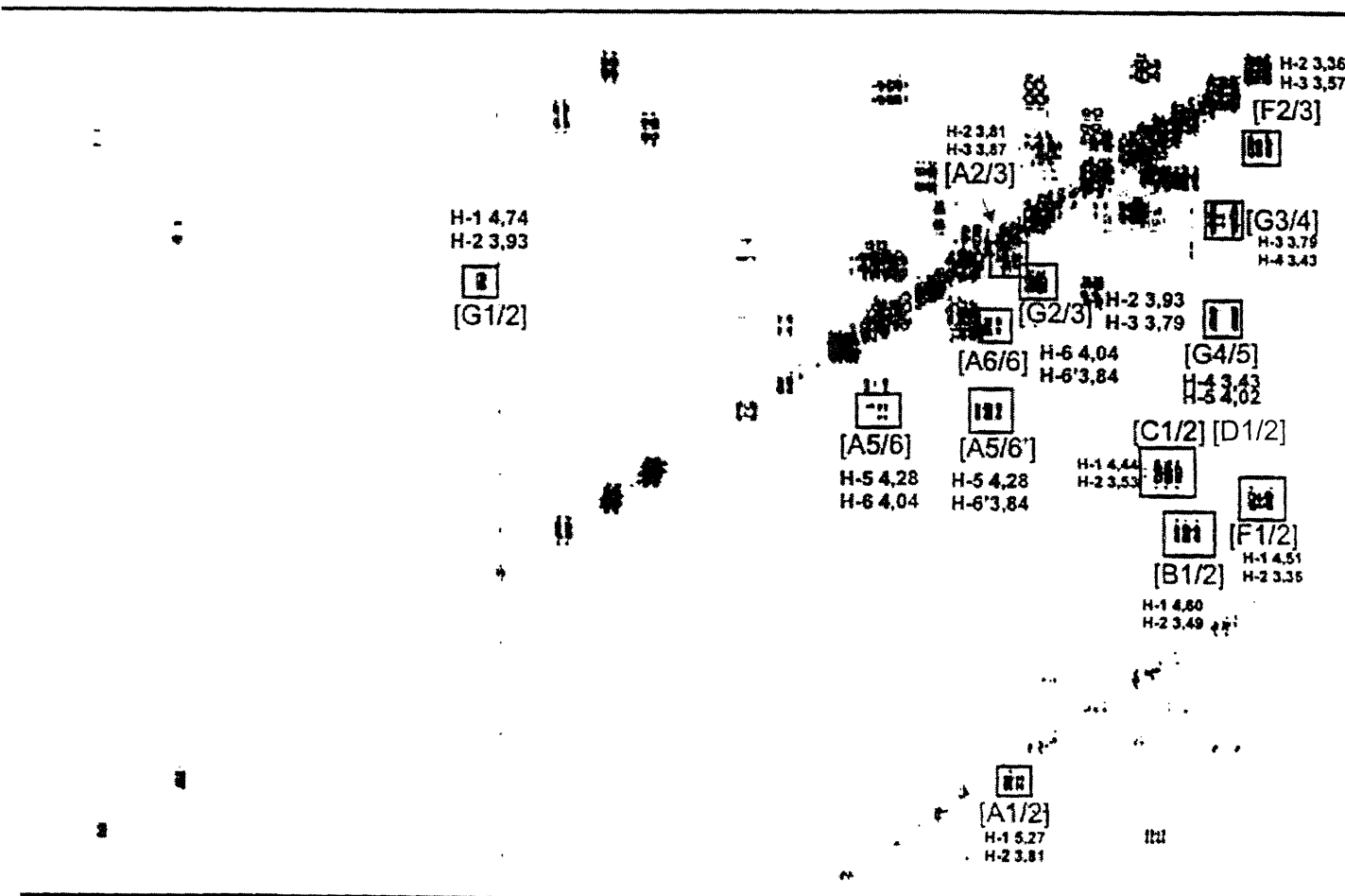


Figura 28: Espectro de RMN de correlação TNDQFCOSY [^1H - ^1H] da fração $\text{F}_{0,32}$, em D_2O , a 30°C .

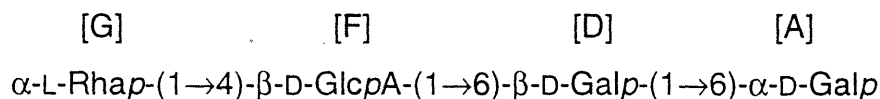
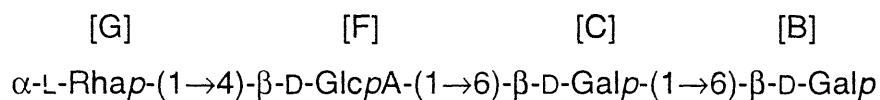
* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. A: α -D-Galp; B: β -D-Galp; C: $\rightarrow 6$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow ; F: $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow ; G α -L-Rhap-(1 \rightarrow .

Para a unidade de β -D-GlcpA, partindo de δ 4,51 obtêm-se o deslocamento para H-2 em δ 3,36. E a partir do deslocamento de H-2, tem-se o deslocamento para H-3 em δ 3,57.

Para unidade terminal de ramnose, partindo do H-1 em δ 4,74 tem-se a correlação com H-2 em δ 3,93. Obtendo-se, os deslocamentos para H-3, H-4 e H-5, em δ 3,79, 3,43 e 4,02, respectivamente.

Na Tabela VIII, estão relacionados os assinalamentos para fração $F_{0,32}$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H 1D e 2D.

Tabela VIII: Assinalamentos (em δ ppm) da fração $F_{0,32}$ obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H



Unidades		H1/C1	H2/C 2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6	H6'
[G]	$\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$	4,74 101,1	3,93 70,7	3,79 70,5	3,43 72,4	4,02 69,4	1,25 16,9	
[F]	$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow$	4,51 103,0	3,36 73,7	3,57 74,7		79,6 76,7		
[C] {D}	$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	4,44 e {4,43} 103,6 e {103,7}	3,53 71,2					
			73,0	69,0				
[A]	$\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Galp}$	5,27 92,8	3,81 68,7	3,87		4,28	4,04	3,84
[B]	$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp}$	4,60 96,9	3,49 72,3	73,1		74,2	69,9	

A fração $F_{0,32}$ foi analisada por espectrometria de massa - ESI-MS, obtendo-se o espectro de massa (Figura 29), que mostrou o pico de íon negativo molecular de massa 663,4 m/z, correspondente a um tetrassacarídeo constituído de 3 unidades de hexoses e uma de ácido urônico. Um pico de fragmentação de

massa de 501,2 m/z, corresponde ao trissacarídeo (menos 1 unidade de hexose). Além de pico de fragmentação de massa de 339,3 m/z, 194,8 m/z e 164,9 m/z, correspondentes, a um dissacarídeo (α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-GlcpA), a unidade de ácido urônico e de ramnose, respectivamente. Esses resultados confirmam a presença do tetrassacarídeo α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp, o qual foi caracterizado por espectroscopia de RMN.

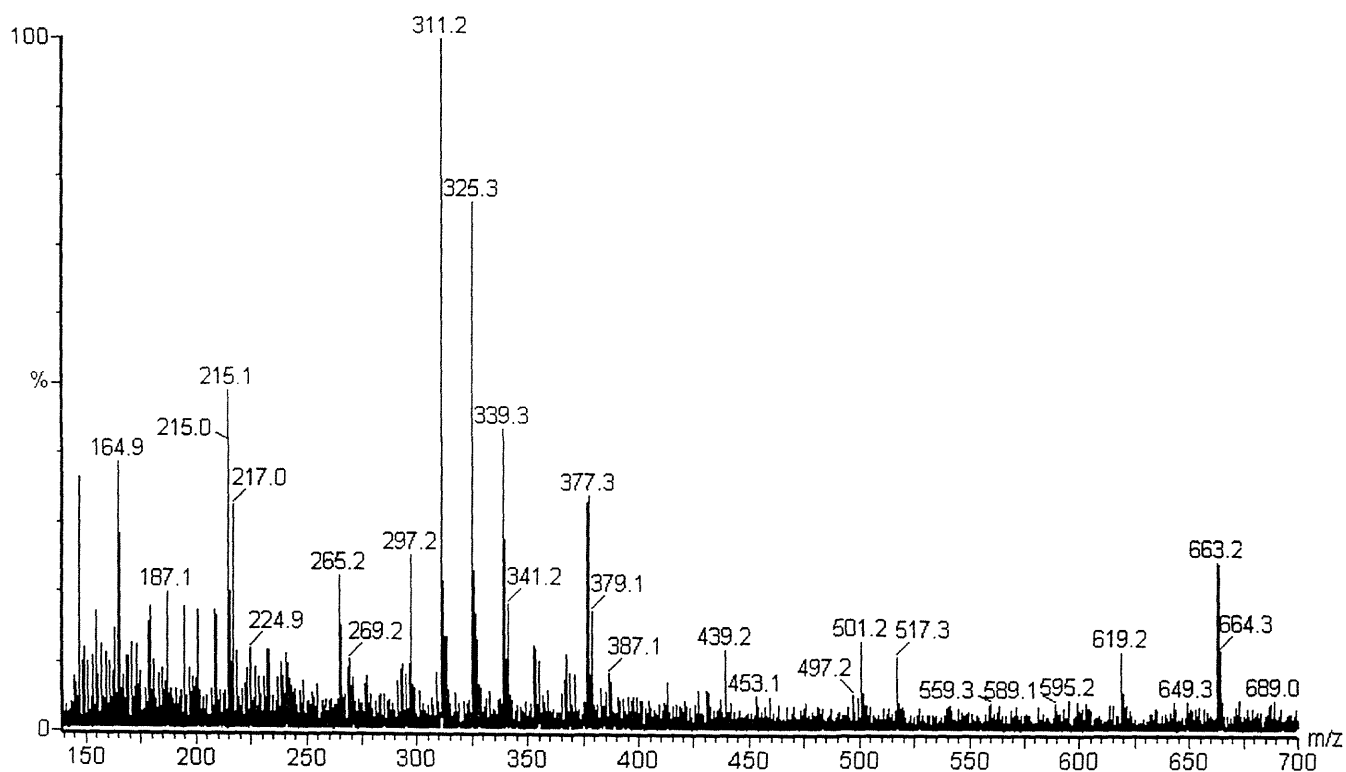


Figura 29: Espectro de espectrometria de massa - ESI-MS da fração F_{0,32}.

A partir da caracterização química das frações obtidas no sobrenadante etanólico do exsudato de *Anacardium occidentale*, mostrou-se a presença dos oligossacarídeos livres redutores: β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp (Frações $F_{0,83}$ e $F_{0,82}$); α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- α β -D-GlcpA (Fração $F_{0,79}$ e $0,70$); α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp (Fração $F_{0,50}$) e α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp (Fração $F_{0,32}$).

Na Figura 30 estão representadas as estruturas químicas dos oligossacarídeos livres redutores caracterizados.

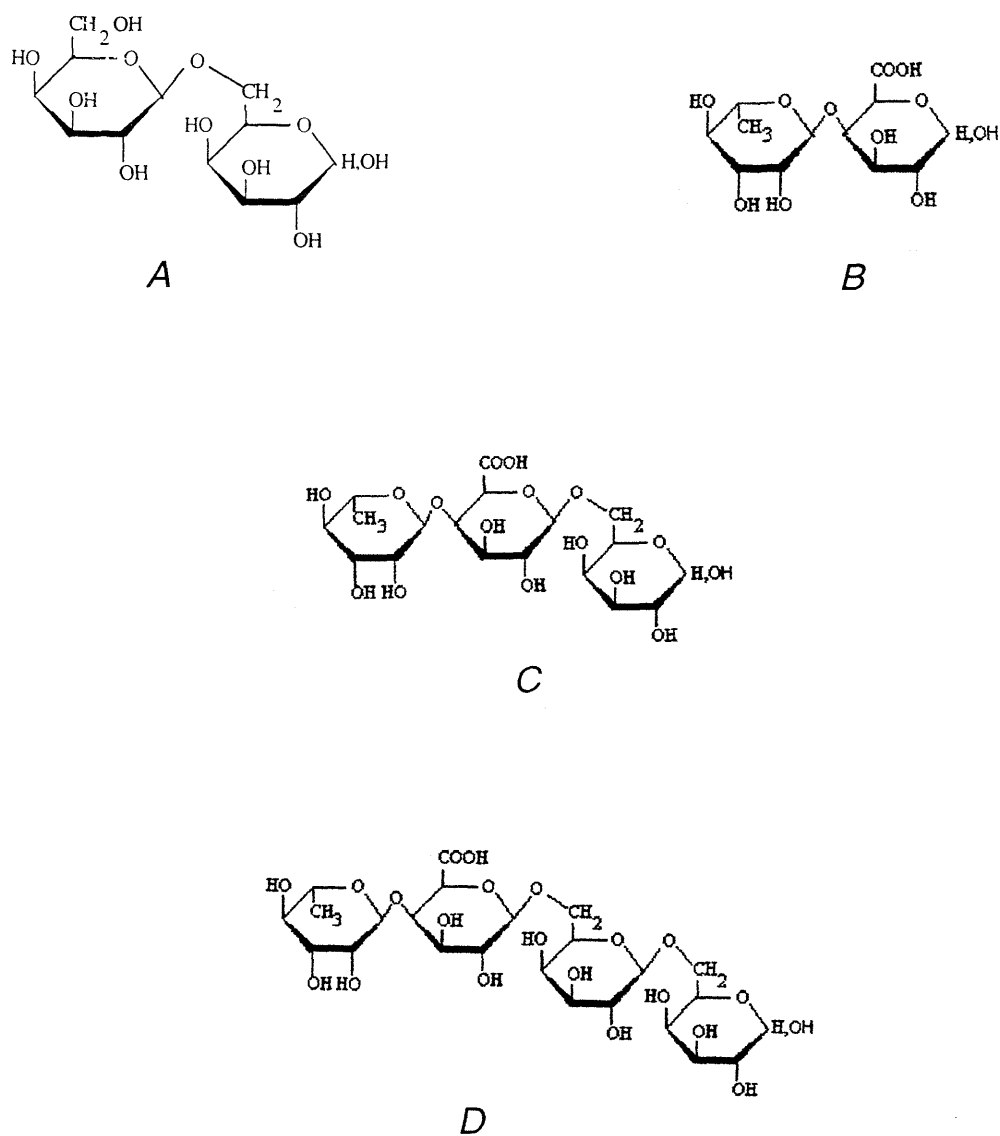


Figura 30: Estruturas químicas dos oligossacarídeos livres redutores presentes no exsudato vegetal de *A. occidentale*.

A: β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp; B: α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- α β -D-GlcpA; C: α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp; D: α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp.

A presença de carboidratos de baixa massa molecular em exsudatos não tinha sido descrita ou investigada, provavelmente em virtude do método utilizado para a obtenção dos polissacarídeos, sendo que o sobrenadante etanólico era descartado (ANDERSON & BELL, 1975; RODRIGUES *et al.*, 1993; DE PAULA *et al.*, 1995).

Porém, recentemente, DELGOBO *et al.* (1994) e DELGOBO *et al.* (1998), descreveram a presença de monossacarídeos livres (0,6% de ramnose, 4,7% de arabinose, 0,1% manose e 0,8% de galactose), e oligossacarídeos livres redutores no exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina*, como o trissacarídeo, α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp. Além disso, verifica-se a presença de outras 11 frações de baixo massa molecular com R_fs diferentes, as quais, a maioria apresentam arabinose na sua composição. Os autores sugerem que os mono- e oligossacarídeos não seriam originados a partir da autohidrólise da goma, mas poderiam ser formados como produtos de biossíntese do polissacarídeo ou de enzimólise *in situ* da goma. Além disso, a caracterização estrutural desses oligossacarídeos contribui na caracterização estrutural do polissacarídeo, que neste caso é altamente complexo e ramificado (DELGOBO *et al.*, 1998).

A presença dos mono- e oligossacarídeos no exsudato de *Anacardium occidentale* poderia ser explicada, como resultado: 1) de autohidrólise a partir do polissacarídeo; 2) de produtos intermediários da biossíntese do polissacarídeo; 3) de produtos formados a partir da ação de hidroxilases endógenas; 4) da ação de hidrolases exógenas, de origem microbiana ou de insetos, que estariam em

contato com o tecido vegetal. A confirmação destas hipóteses poderia concluir qual a origem dos mono- e oligossacarídeos livres presentes no exsudato do cajueiro.

Porém, com relação, a autohidrólise *in situ* da goma fracamente ácida (pH 5,5), seria pouco provável, considerando a resistência das ligações piranosídicas em temperaturas ambientais. Outras hipóteses mais prováveis, seriam que estas moléculas sejam produtos de intermediários biossintéticos ou formados pela ação de hidrolases endógenas ou exógenas.

Um ponto importante a considerar é a relação entre as estruturas químicas dos oligossacarídeos e as cadeias laterais do polissacarídeo presente na goma.

Os resultados que se seguem mostram a caracterização do polissacarídeo do cajueiro de origem brasileira, podendo assim inferir sobre a origem dos mono- e oligossacarídeos livres redutores.

4.2 POLISSACARÍDEO NATIVO DO EXSUDATO VEGETAL DE *Anacardium occidentale* L. (CAJUEIRO)

4.2.1 Obtenção do polissacarídeo presente no exsudato vegetal de *A. occidentale*

Os exsudatos vegetais são, geralmente, solúveis em água e por isso, seus polissacarídeos podem ser obtidos por processos simples de isolamento, como por exemplo, extração aquosa com posterior precipitação etanólica. Esta facilidade, pode estar relacionada, principalmente, ao fato de que estes polissacarídeos não estariam associados a outros polímeros constituintes da parede celular vegetal (ASPINALL, 1982b; STEPHEN, 1983).

Dentre os procedimentos para isolamento de polissacarídeos oriundos de exsudatos descritos na literatura (ANDERSON *et al.*, 1974; RODRIGUES *et al.*, 1993), optou-se neste trabalho em utilizar a metodologia descrita por DELGOBO (1993), com algumas modificações, em que o exsudato vegetal de *A. occidentale* foi solubilizado em água, filtrado e submetido à precipitação etanólica (3 x volume de etanol). O precipitado foi ressuspenso em água, dialisado e liofilizado. O etanol atua como agente desidratante, promovendo a insolubilidade do polissacarídeo, precipitando-o. A proporção de álcool:água utilizada na obtenção de polissacarídeos por precipitação etanólica é importante afim de evitar a coprecipitação de proteínas (RINAUDO, 1993). A precipitação etanólica e o esquema de obtenção do polissacarídeo estão demonstrados nas Figuras 31 e 32. A partir deste procedimento obteve-se um rendimento de 80% de

polissacarídeo, o qual foi semelhante a dos outros procedimentos descritos na literatura (ANDERSON *et al.*, 1974; RODRIGUES *et al.*, 1993). É importante ressaltar que este método permite obter os carboidratos de baixa massa molecular, presentes no sobrenadante etanólico, os quais, também, foram objeto de estudo deste trabalho.

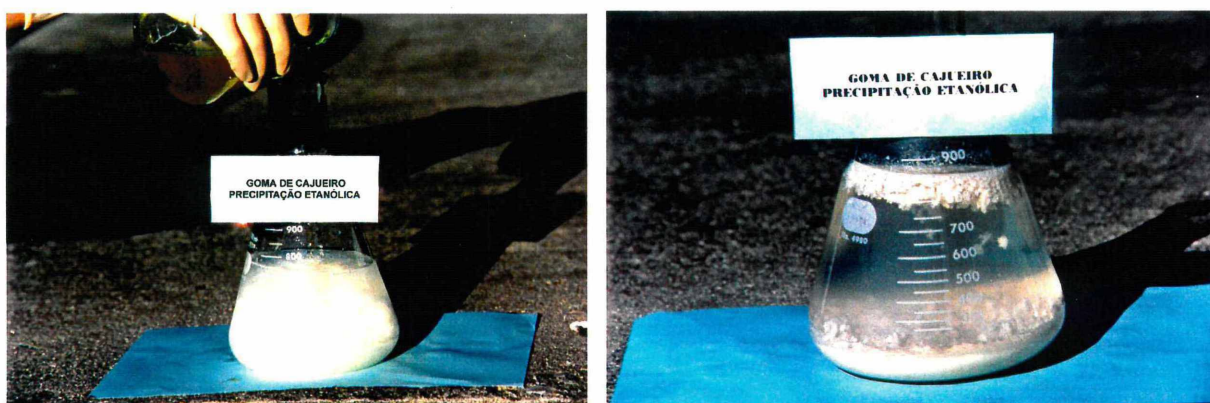


Figura 31: Precipitação etanólica do exsudato vegetal de *Anacardium occidentale*.

O teor de umidade foi determinado tanto para a goma como para o polissacarídeo do cajueiro, de acordo com o método descrito por SMITH, R.J. (1964), obtendo-se 15% e 10%, respectivamente, resultados similares ao encontrado para a goma e polissacarídeo de cajueiro de outras origens (ANDERSON *et al.*, 1974; LÉON DE PINTO *et al.*, 1995; COSTA *et al.*, 1996).

O polissacarídeo obtido apresentou um conteúdo de proteína de 0,5%, idêntico ao encontrado por MARQUES & XAVIER-FILHO (1991) para a goma de cajueiro (origem brasileira - Ceará), que foi inferior ao encontrado para o polissacarídeo do cajueiro de outras regiões geográficas. O conteúdo de proteína determinado para o polissacarídeo do cajueiro de outras regiões geográficas foi

de 2,80% (Índia) (ANDERSON *et al.*, 1974), 1,0% (Nova Guiné) (ANDERSON *et al.*, 1974), de 0,94% (Venezuela) (LÉON DE PINTO *et al.*, 1995) e 1,19% (Brasil - Ceará) (COSTA *et al.*, 1996). De maneira geral, o conteúdo de proteína encontrado para o polissacarídeo do cajueiro pode ser considerado muito pequeno, comparando-se ao encontrado para outras gomas como de *Acacia hebeclada* (53 a 56%) (ANDERSON & FARQUHAR, 1979) e *Acacia torulosa* (42%) (ANDERSON & GILL, 1975).

Abaixo estão descritos outros procedimentos, citados na literatura, para o isolamento do polissacarídeo presente no exsudato vegetal de *A. occidentale* de diferentes regiões geográficas.

ANDERSON *et al.* (1974) utilizaram o procedimento mais simples para obtenção do polissacarídeo do exsudato de *A. occidentale* (espécies indiana e papuana), o qual corresponde a solubilização da goma a 10% p/v em água, com posterior, filtração, diálise em água e liofilização. Para este procedimento obteve-se um rendimento de 80%. O procedimento utilizado por LÉON DE PINTO *et al.* (1995) para obtenção do polissacarídeo de cajueiro de origem venezuelana foi o mesmo descrito por ANDERSON *et al.* (1974), porém, não foi comentado o rendimento obtido.

RODRIGUES *et al.* (1993) descreveram o procedimento para a obtenção do polissacarídeo do exsudato de *A. occidentale* (Pacajus-CE), no qual, a solução de goma a 4% (p/v) neutralizada com NaOH aquoso e filtrada, foi precipitada com etanol, sendo que o polissacarídeo (ou goma isolada) obtido no precipitado foi lavado com etanol e acetona e posteriormente secado, obtendo-se um rendimento de 78%. O filtrado foi descartado.

COSTA *et al.* (1996) propuseram um método para purificação de exsudatos

naturais, na tentativa de obtenção de uma goma de elevado grau de pureza e totalmente na forma de sal de sódio, utilizando-se da goma de *A. occidentale* (EMBRAPA - Pacajus-CE) como substância-teste. Após a etapa de isolamento (anteriormente descrita), a goma isolada foi submetida a primeira etapa de purificação, tendo como objetivo substituir os cátions presentes na goma por Na⁺, e além disso retirando possíveis impurezas ainda presentes. Para isso, à solução de goma isolada a 4% (p/v) em água adicionou-se 5 g de NaCl por 100 mL, e posteriormente, esta foi submetida a precipitação etanólica. Para retirar o excesso de NaCl que precipitou com a goma na primeira purificação, foi realizada uma segunda etapa de purificação, utilizando uma solução de goma em água a 3% (p/v), que foi submetida as mesmas etapas citadas para o processo de isolamento. Após a segunda etapa de purificação, a goma foi submetida a cromatografia de troca-iônica (Amberlite IR-120 H⁺). A troca dos íons H⁺ por Na⁺ da coluna foi previamente feita pela eluição de uma solução de NaCl 1M. A solução de goma na forma de sal de Na⁺, oriunda da coluna foi liofilizada, posteriormente (COSTA *et al.*, 1996). Em cada estágio de purificação descrito, foram avaliadas características como rendimento, teor de umidade, cinzas, percentuais de nitrogênio, de proteína e de ácidos urônicos, viscosidade intrínseca, bem como análise das amostras em GPC. De acordo com os autores (COSTA *et al.*, 1996), a goma submetida a esses processos apresentou um alto teor de pureza, boa solubilidade, e como desejado, foi transformada predominantemente em sal de sódio. Além disso, ocorreu pequena diminuição tanto no teor de proteína (de 1,75 para 1,06 %), como na massa molecular média em massa (M_w) (de 6,5 x 10⁴ para 5,0 x 10⁴) (COSTA *et al.*, 1996).

DE PAULA *et al.* (1998), utilizando o exsudato de *A. occidentale* (Pacajus-CE), isolaram o polissacarídeo de acordo com o método descrito por ANDERSON *et al.* (1974), porém a solução da goma foi neutralizada para pH 6,0, com adição de NaOH aquoso, e obtiveram um rendimento de 65%. Posteriormente, foi realizado um fracionamento com um sistema solvente/não solvente, sendo o polissacarídeo isolado (5,0 g em 500 mL), precipitado com etanol, sob agitação, a 25°C até que a solução tornou-se turva, e, subsequentemente, sem agitação, a temperatura foi elevada até 40°C. Após a solução estar límpida, a temperatura foi alterada novamente para 25°C. O precipitado foi removido após 18 horas, e liofilizado. A fase líquida foi novamente submetida à precipitação etanólica, como descrito acima. A partir deste fracionamento, utilizando água/etanol como um sistema solvente/não-solvente, obteve-se 22 frações, as quais foram analisadas por GPC, difusão de luz e coeficiente de sedimentação.

Na Figura 32 está representado, esquematicamente, os diferentes métodos de obtenção do polissacarídeo presente no exsudato vegetal de *A. occidentale*, descritos acima.

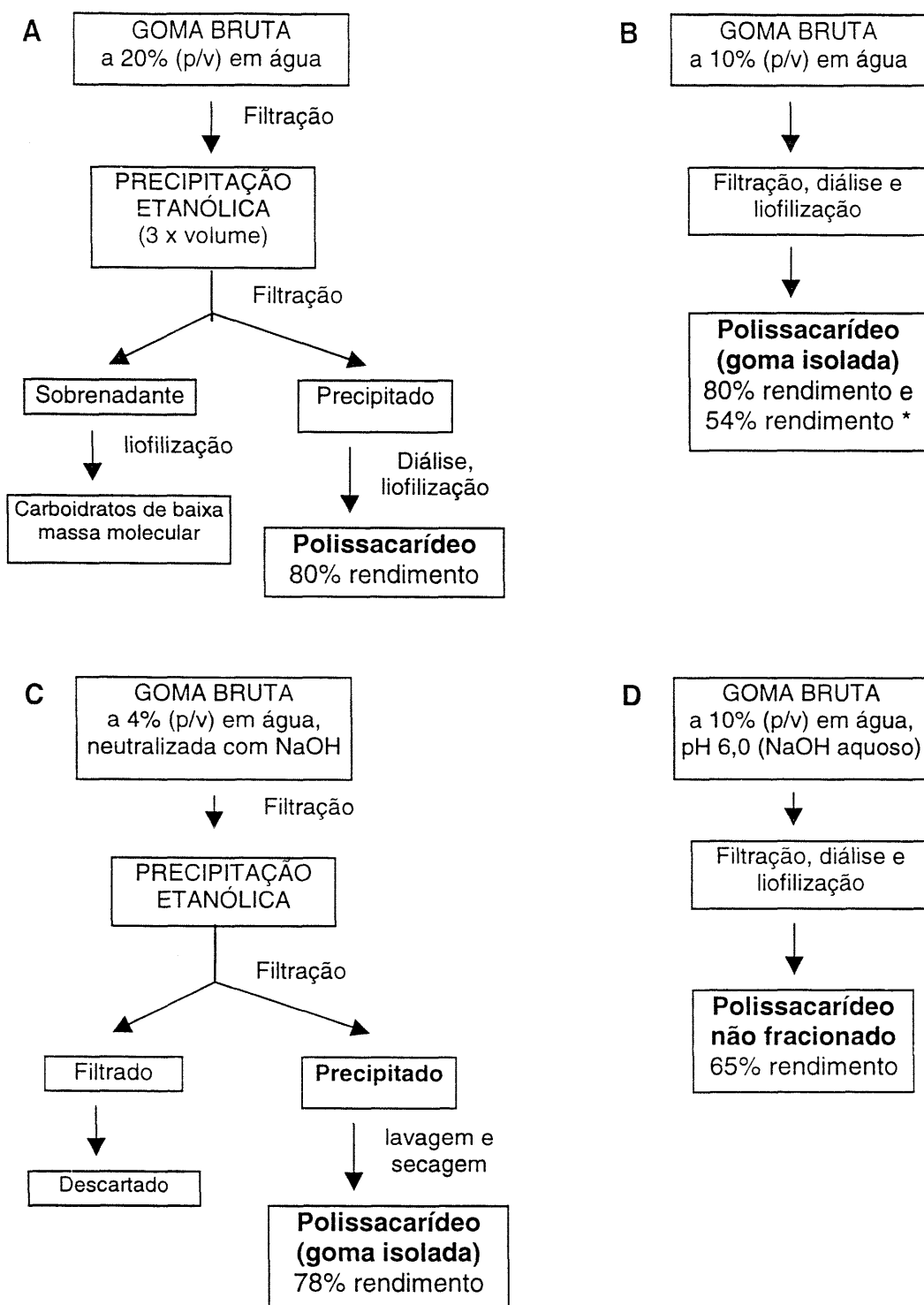


Figura 32: Descrição dos diferentes métodos para obtenção do polissacarídeo presente no exsudato vegetal de *A. occidentale*.

A) DELGOBO (1993) com modificações; **B)** ANDERSON *et al.* (1974); ANDERSON & BELL (1975)*; LÉON DE PINTO *et al.* (1995). **C)** RODRIGUES *et al.* (1993); DE PAULA & RODRIGUES (1995); COSTA *et al.* (1996); **D)** DE PAULA *et al.* (1998).

4.2.2 Homogeneidade e determinação da massa molecular da fração polissacarídica do exsudato vegetal de *A. occidentale*

A determinação das massas moleculares ponderais médias em massa (M_w) e em número (M_n), bem como a homogeneidade da fração polissacarídica de *A. occidentale*, anteriormente, foi verificada por cromatografia de exclusão estérica (SEC), acoplada a multidetectores. Este método possibilita a determinação de valores absolutos da massa molecular média em massa (M_w) (BILLMEYER, 1962) sendo considerado um método válido para caracterizar polissacarídeos em uma larga faixa de massas moleculares (RINAUDO, 1993). Obteve-se, valores para massa molecular média em massa (M_w), de $1,12 \times 10^5 (\pm 0,03)$, e para a massa molecular média em número (M_n) de $9,62 \times 10^4 (\pm 0,3)$. A razão M_w/M_n calculada foi de $1,165 \pm 0,045$, sugere um polímero com baixo grau de polidispersidade, próximo a 1,0 (BILLMEYER, 1971). O perfil de eluição do polissacarídeo obtido do exsudato de *A. occidentale* está mostrado na Figura 33, indicando a ausência de agregados moleculares, podendo ser considerado um sistema homogêneo.

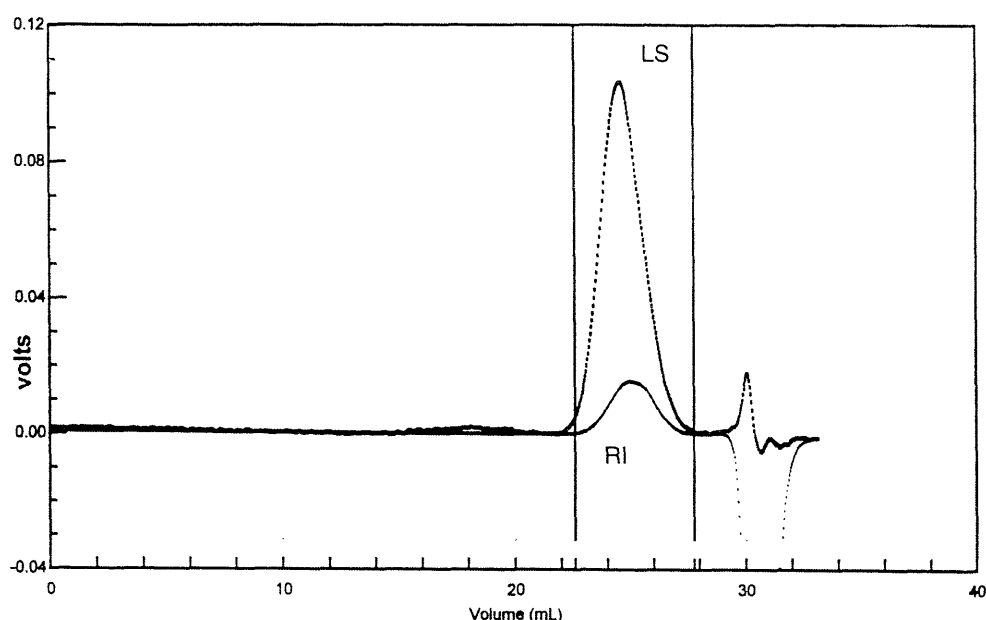


Figura 33: Perfil de eluição do polissacarídeo do exsudato vegetal de *A. occidentale*, obtido pela cromatografia de exclusão estérica (SEC), usando detectores de difusão de luz (LS) e índice de refração (RI).

Abaixo estão descritos outros resultados, relatados na literatura, sobre determinação da homogeneidade e da massa molecular ponderal média da fração polissacarídica presente no exsudato vegetal de *A. occidentale* de diferentes regiões geográficas.

ANDERSON *et al.* (1974), utilizando a goma de cajueiro de origem indiana e papuana, determinaram a massa molecular (Bio-Gel A-15M; solvente NaCl 1 M), obtendo-se os valores de M_w de 2,6 e 1,8 ($\times 10^5$) para as respectivas espécies. Além disso, examinaram amostras (origem indiana) liofilizadas e armazenadas em diferentes tempos, e verificaram que ocorreu uma variação da massa molecular média (por difusão de luz) variando de $1,53 \times 10^5$, $4,50 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^5$,

correspondente as amostras sem armazenamento, com 15 dias e com 6 semanas de armazenamento, respectivamente. Os autores relataram que amostras de gomas liofilizadas podem sofrer auto-agregação, como ocorre para os exsudatos do gênero *Acacia*, bem como para amostras com baixo conteúdo de ácido urônico.

ANDERSON & BELL (1975) verificaram a homogeneidade da goma de cajueiro (espécie indiana) por quatro diferentes métodos, como, eletroforese em fita de acetato de celulose, eletroforese em camada delgada, cromatografia de troca-iônica e ultracentrifugação. Em todos os métodos, observaram a presença de um sistema formado por um único componente, considerando a goma de *A. occidentale* como um sistema homogêneo. Este comportamento foi similar, ao descrito para outras gomas do gênero *Acacia* (ANDERSON *et al.*, 1966a; ANDERSON *et al.*, 1968; ANDERSON & MUNRO, 1970), e da goma de *Lannea humilis* (ANDERSON & HENDRIE, 1972). Porém, pelos resultados de cromatografia em peneira molecular (Bio-Gel A5m), verificaram a presença de um grande e largo pico simétrico eluído com volume de 56 mL, além de um pequeno pico eluído no volume morto, o qual concluíram que seria devido a presença de agregados moleculares (ANDERSON & BELL, 1975).

DE PAULA & RODRIGUES (1995) relataram que pelo perfil de GPC (em FPLC, com detector de UV-1 e densitômetro - PAAR-DMA-60/602) da goma de *A. occidentale* (origem brasileira, Pacajus-CE) em NaCl 1M, um comportamento de um sistema heterogêneo. Os autores citaram que este comportamento foi similar ao encontrado para goma arábica (*Acacia senegal* - Sudan) realizado por VANDEVELDE & FENYO (1985). O cromatograma de GPC apresentou três (3) picos,

denominados de A, B, e C. Os autores concluíram que o pico A, único detectável por ultravioleta, seria uma fração formada por um complexo polissacarídeo-proteína (arabinogaiactana-proteína), que corresponde a 6% da goma isolada. Os picos B (rendimento 42%) e C (rendimento 52%) correspondem ao polissacarídeo com diferentes massas molecular. A massa molecular aparente determinada foi de 9×10^5 , $3,2 \times 10^4$, $1,6 \times 10^4$, para os picos A, B, e C respectivamente. Esses resultados foram semelhantes aos descrito por COSTA *et al.* (1996), para o polissacarídeo do cajueiro (origem brasileira - Pacajus-CE).

DE PAULA *et al.* (1998) determinaram a massa molecular do polissacarídeo de *A. occidentale* (origem brasileira - Pacajus-CE) e das frações obtidas após o fracionamento da goma isolada por GPC com detector de refratômetro diferencial e de difusão de luz. O polissacarídeo não-fracionado apresentou dois principais picos no cromatograma, com picos de massas molares (M_w) de $2,8 \times 10^4$ e $6,7 \times 10^4$, além de traços de um pico de alta massa molecular ($M > 5 \times 10^5$), o qual foi atribuído como um complexo polissacarídeo-proteína. A massa molecular média em massa (M_w) atribuída por GPC com detector de índice de refração foi de $9,5 \times 10^4$ e a calculada por GPC com detector de difusão de luz foi de $1,13 \times 10^5$. A massa molecular média em número (M_n) calculada por GPC com detector de difusão de luz foi de $4,5 \times 10^4$. Os autores (DE PAULA *et al.*, 1998) estimaram a M_n por espectroscopia de RMN, obtendo-se o valor de $2,1 \times 10^4$, assumindo somente uma unidade de galactose redutora por molécula e considerando a intensidade dos sinais destas unidades, em relação, a intensidade total dos sinais dos outros carbonos anoméricos. A discrepância encontrada entre os valores de M_n por GPC e RMN é explicada pelos autores (DE PAULA *et al.*, 1998), considerando que a

distribuição do pico de baixa massa molecular ($2,1 \times 10^4$) representa moléculas únicas de polissacarídeo (uma extremidade redutora), enquanto que o pico de alta massa molecular ($4,5 \times 10^4$) representa “clusters” de moléculas (várias extremidades redutoras por “clusters”), os quais estão fisicamente ou quimicamente ligadas.

Relacionando o método de obtenção da fração polissacarídica e os resultados obtidos na determinação da homogeneidade e da massa molecular, neste trabalho obteve-se um perfil de um sistema homogêneo por SEC, utilizando o método **A** (Figura 28). O perfil de um sistema homogêneo do polissacarídeo obtido pelo método **B**, foi verificado, também por ANDERSON *et al.* (1974) para amostras imediatamente liofilizadas, em cromatografia de peneira molecular (Bio-Gel A15M) e por ANDERSON & BELL (1975) pelos quatros sistemas utilizados. Porém, os resultados obtidos por ANDERSON & BELL (1975), em cromatografia de peneira molecular (Bio-Gel A5m) mostraram a presença de agregados moleculares. Com relação, aos valores de massa molecular ponderal média obtida para os polissacarídeo de origem indiana ($2,6 \times 10^5$) e papuana ($1,8 \times 10^5$) (ANDERSON *et al.* (1974), foram semelhantes ao encontrado para a espécie brasileira de procedência de Caruaru (PE) ($1,12 \times 10^5$), ambos determinados por difusão de luz.

Os resultados encontrados por DE PAULA & RODRIGUES (1995) e COSTA *et al.*, (1996), os quais utilizaram o método **C** de obtenção do polissacarídeo, também verificaram um perfil de um sistema heterogêneo em GPC, porém concluíram que o pico de maior massa molecular era devido a presença de um complexo arabinogalactana-proteína. Os resultados de GPC do polissacarídeo

não fracionado descritos por DE PAULA *et al.* (1998), foram semelhantes aos dos autores citados (DE PAULA & RODRIGUES, 1995; COSTA *et al.*, 1996), apesar de utilizarem o método **D** para obtenção do polissacarídeo. Os valores de massa molecular ponderal média descrito por DE PAULA & RODRIGUES (1995) e COSTA *et al.*, (1996) foi de $6,5 \times 10^4$ (por desitometria) e o descrito por DE PAULA *et al.* (1998), foi de $9,5 \times 10^4$ (por detector de índice de refração) e de $1,13 \times 10^5$ (por difusão de luz).

A Tabela IX compara os resultados obtidos, com relação, a homogeneidade, a determinação da massa molecular média ponderal em massa (M_w) e da concentração de proteína da fração polissacarídica presente no exsudato vegetal de *A. occidentale* de diferentes regiões geográficas.

Tabela IX: Comparação dos resultados obtidos, com relação, à homogeneidade, à determinação da massa molecular média ponderal em massa (M_w) e da [proteína] da fração polissacarídica presente no exsudato vegetal de *Anacardium occidentale* de diferentes regiões geográficas.

Fração polissacarídica do exsudato vegetal do <i>Anacardium occidentale</i> - Região geográfica -	Tipo de método de obtenção utilizado	Tipo de sistema	M_w	[proteína] (%)
Brasil (Caruaru-PE) ^a	A	⁽¹⁾ homogêneo (unimodal)	⁽¹⁾ $1,12 \times 10^5$	⁽²⁾ 0,50
Índia ^b	B	⁽³⁾ homogêneo (unimodal)	⁽⁴⁾ $2,6 \times 10^5$	⁽⁵⁾ 2,80
Nova Guiné ^b	B	⁽³⁾ homogêneo (unimodal)	⁽⁴⁾ $1,8 \times 10^5$	⁽⁵⁾ 1,00
Brasil (Pacajus-CE) ^c	C	⁽⁶⁾ heterogêneo (trimodal)	⁽⁶⁾ $6,5 \times 10^4$	⁽⁵⁾ 1,13
Brasil (Pacajus-CE) ^d	D	⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾ heterogêneo (trimodal)	⁽⁷⁾ $9,5 \times 10^4$ ⁽⁸⁾ $1,13 \times 10^5$	-

^a dados da presente tese, ⁽¹⁾ por GPC acoplado a detector de índice de refração e difusão de luz (SEC);

^b ANDERSON *et al.* (1974), ⁽³⁾ homogêneo pelos quatros sistemas descritos no texto, porém por cromatografia de peneira molecular mostrou-se a presença de agregados moleculares, ⁽⁴⁾ por difusão de luz;

^c DE PAULA & RODRIGUES (1995); COSTA *et al.* (1996), ⁽⁶⁾ por GPC acoplado a densitômetro;

^d DE PAULA (1998), ⁽⁷⁾ por GPC acoplado a detector de índice de refração, ⁽⁸⁾ por GPC acoplado a difusão de luz;

⁽²⁾ O conteúdo de proteína foi dosado pelo método de BRADFORD (1976) e ⁽⁵⁾ pelo método de KJELDAHL (N x 6,25).

4.2.3 Caracterização estrutural do polissacarídeo obtido do exsudato vegetal de *A. occidentale*

4.2.3.1 Determinação da composição monossacarídica do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de *A. occidentale*

O polissacarídeo do exsudato vegetal de *A. occidentale* (Caruaru-PE), foi caracterizado, primeiramente, em relação a sua composição monossacarídica. Este polissacarídeo é constituído por ramnose, arabinose, xilose, galactose, glucose e ácido glucurônico na proporção molar de 2:4:1:82:6:5. A Tabela X apresenta a composição monossacarídica sugerida para o polissacarídeo do exsudato vegetal de *Anacardium occidentale* obtido de diferentes regiões geográficas.

Em relação a esses dados, o polissacarídeo de origem brasileira apresenta menos arabinose e ramnose, além de maior conteúdo de galactose, do que os de origem indiana (7% Rha; 14% Ara; 61% Gal) e papuana (7% Rha; 15% Ara; 63% Gal) (ANDERSON *et al.*, 1974). Comparando-se os resultados, com relação ao polissacarídeo de origem brasileira (Pacajus-CE), este apresenta maior conteúdo de glucose (14%) (DE PAULA & RODRIGUES, 1995; DE PAULA *et al.*, 1998), do que o de Caruaru (PE) (6%).

Em relação a composição monossacarídica, observou-se diferenças mais pronunciadas, comparando-se com polissacarídeo do cajueiro de origem venezuelana estudado por LÉON DE PINTO *et al.* (1995), que apresentou-se constituído por 7% de ramnose, 31% de arabinose, 1% de xilose, 49% de

galactose, 4% de manose e 8% de ácido urônico, não constatando a presença de glucose.

Tabela X: Composição monossacarídica do polissacarídeo do exsudato vegetal de *Anacardium occidentale* obtido de diferentes regiões geográficas

Monossacarídeo constituente	Composição em moles % do polissacarídeo					
	Brasil (PE)	Índia ^(a)	Papua ^(a)	Venezuela ^(b)	Brasil (CE) ^(c)	Brasil (CE) ^(d)
4- <i>O</i> -metil GlcpA		1,9 ⁽²⁾	1,2 ⁽²⁾	+ ⁽⁴⁾		
ácido glucurônico	5,0 ⁽¹⁾	4,3 ⁽³⁾	4,5 ⁽³⁾	8,0 ⁽³⁾	6,3 ⁽⁵⁾	4,5 ⁽¹⁾
arabinose	4,0	14,0	15,0	31,0	5,0	4,6
galactose	82,0	61,0	63,0	49,0	73,0	72,0
glucose	6,0	8,0	9,0	-	11,0	14,0
manose		2,0	1,0	4,0	1,0	
ramnose	2,0	7,0	7,0	7,0	4,0	3,2
xilose	1,0	2,0	-	1,0		

⁽¹⁾ método do *m*-hidroxi-bifenil (BLUMENTRANZ & ASBOE-HANSEN, 1973); ⁽²⁾ Dosagem de grupos metoxil, por infravermelho; ⁽³⁾ determinação do conteúdo de ácido urônico total por infravermelho; ⁽⁴⁾ a presença do derivado 4-*O*-metil-GlcpA foi verificada pelo espectro de RMN-¹³C; ⁽⁵⁾ método de titulação conductométrica.

^(a) ANDERSON *et al.* (1974); ^(b) LÉON DE PINTO *et al.* (1995); ^(c) DE PAULA & RODRIGUES (1995); ^(d) DE PAULA *et al.* (1998).

Com relação, a composição monossacarídica dos polissacarídeos do exsudato do cajueiro, existiram diferenças, porém, seria importante salientar, que nos trabalhos relatados, utilizaram-se diferentes metodologias para quantificação dos monossacarídeos. No presente trabalho, a metodologia utilizada foi a CG-EM. A CG-EM é uma técnica sensível, podendo ser analisadas quantidades sub-nanomolares de carboidratos, bem como, está sujeita a menos interferências, como por exemplo, sais ou proteínas. Entretanto, nesta técnica é fundamental a preparação de derivados voláteis de carboidratos (CHAPLIN, 1994). DE PAULA & RODRIGUES (1995), utilizaram a metodologia de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). DE PAULA *et al.* (1998), realizaram a análise da composição monossacarídica por cromatografia líquida gasosa (GLC), porém, na ausência dos espectros de fragmentação de massas dos acetatos de alditóis. ANDERSON *et al.* (1974) quantificaram os monossacarídeos por cromatografia de partição em papel. LÉON DE PINTO *et al.* (1995) separaram os monossacarídeos por cromatografia de partição em papel preparativa (Whatman nº3), com posterior eluição e determinação da composição monossacarídica pelo método espectrofotométrico para açúcares totais descrito por DUBOIS *et al.* (1956). A cromatografia de partição em papel e a dosagem de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956) podem ser consideradas técnicas imprecisas para a determinação de composição monossacarídica. Porém, pode-se ressaltar, que os dados de composição monossacarídica do polissacarídeo do cajueiro (origem indiana) obtidos por ANDERSON *et al.* (1974), são concordantes com os resultados da análise de metilação deste polissacarídeo realizado por ANDERSON & BELL (1975) (ver página 145).

Outro aspecto relevante a ser comentado, seria sobre a presença do derivado 4-*O*-metil glucurônico, o qual foi verificado nos polissacarídeos de cajueiro de origem indiana e papuana (ANDERSON *et al.*, 1974; ANDERSON & BELL, 1975) e de origem venezuelana (LÉON DE PINTO *et al.*, 1995). Para o polissacarídeo de origem indiana, ANDERSON *et al.* (1974) relataram que este contém ácido glucurônico (4,3 %) e menor quantidade do seu derivado 4-*O*-metil, considerando-se: (1) as dosagens de ácido urônico total e de grupos metoxil por infravermelho e (2) os resultados obtidos por ANDERSON & BELL (1975), os quais isolaram dois ácidos aldobiurônicos: 6-*O*-β-D-glucopiranosil(ácido urônico)-D-galactose (principal componente) e o 6-*O*-(4-*O*-metil-β-D-glucopiranosil ácido urônico)-D-galactose (menor componente). ANDERSON & BELL (1975), relataram que para o ácido aldobiurônico (menor componente) não obteve-se quantidade suficiente para completa caracterização, sendo que sua identificação foi baseada pelo seu *R_f* (em cromatografia de partição em papel), o qual foi idêntico a um 6-*O*-(4-*O*-metil-β-D-glucopiranosil ácido urônico)-D-galactose (padrão).

Para o polissacarídeo de origem venezuelana (LÉON DE PINTO *et al.*, 1995) a presença do derivado 4-*O*-metil glucurônico foi verificada pelo espectro de RMN-¹³C (sinal em δ 60,1, para C-4) (ver página 153).

KAPOOR *et al.* (1991) estudaram o polissacarídeo do exsudato vegetal de *Acacia nilotica*, de 8 regiões geográficas diferentes. Foram analisados vários aspectos como, a determinação da rotação ótica, dos monossacarídicos constituintes, da concentração de proteína, e da viscosidade intrínseca, além da análise estrutural por espectroscopia de RMN-¹³C. Todas as amostras estudadas apresentaram diferenças nos aspectos analisados, porém, com características

estruturais de arabinogalactanas. Esses autores, relataram que fatores ambientais, como as condições climáticas, composição do solo e outros fatores do habitat possam influenciar na composição do polissacarídeo.

4.2.3.2. Determinação da configuração absoluta dos constituintes monossacarídeos do polissacarídeo nativo e da sua rotação ótica específica

Para a determinação da configuração absoluta dos componentes monossacarídicos, o polissacarídeo nativo do cajueiro foi submetido à hidrólise ácida total (em TFA 2M) obtendo-se um resíduo cristalizado, o qual foi analisado por espectroscopia de RMN de ^{13}C e polarimetria. O resultado do espectro de RMN- ^{13}C , mostrou a presença de $\alpha\beta$ -galactose. A rotação específica obtida foi de $[\alpha]_{\text{D}}^{25^\circ} +134^\circ$ (valor inicial) até um valor constante de $+79^\circ$ (80 s), correspondente ao enantiômero D (GORIN & MAZUREK, 1975; PIGMAN & ISBELL, 1968).

O sobrenadante resultante do processo de cristalização foi fracionado por cromatografia de partição em celulose, e a eluição foi feita com acetona e acetona:água (10:1, v/v). As frações obtidas foram analisadas por RMN - ^{13}C e na forma de derivados acetatos dos seus (-)-2-octilglicosídeos por CG-EM. A análise desses resultados mostrou a presença L-arabinose, L-ramnose, and D-glucuronolactona (R_{rha} 1,04, solvente 1) (GORIN *et al.*, 1985).

A rotação específica foi realizada obtendo-se para o polissacarídeo nativo do cajueiro, um valor positivo de $[\alpha]_{\text{D}}^{25^\circ} = +21^\circ$. Este valor sugere a presença de estrutura principal do tipo β -D-Galp.

Semelhantes valores de $[\alpha]_D^{25^\circ}$ foram obtidos, para o polissacarídeo do cajueiro, espécies indiana, de $+24,2^\circ$ e papuana, de $+23,6^\circ$ (ANDERSON *et al.*, 1974; ANDERSON & BELL, 1975). Para o polissacarídeo do cajueiro, de origem venezuelana (LÉON DE PINTO *et al.*, 1995), foi obtido um valor para $[\alpha]_D^{25^\circ}$ de $+36^\circ$, superior ao encontrado para o polissacarídeo de outras regiões geográficas.

4.2.3.3 Análise de metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de *A. occidentale*

O polissacarídeo nativo (PN) foi submetido à metilação pelas técnicas de HAWORTH (1915), CIUCANU & KEREK (1984) e KUHN *et al.* (1955) e mostrou unidades terminais não redutoras de Araf (2%), Rhap (2%), Glcp (< 10%) e Galp (19%) e outras unidades de Galp 3-*O*- (6%), 4-*O*- (10%), 6-*O*- (19%), e 3,6-di-*O*-substituídas (32%). Quando este polissacarídeo pré-*O*-metilado foi reduzido com LiAlD₄ e o produto convertido a alditóis acetatos parcialmente *O*-metilados foi verificada a presença de unidades terminais não-redutoras e 4-*O*-substituídas de ácido glucurônico (Tabela XII, página 168).

Pode-se salientar, que os dados de metilação, mostram a presença das unidades de ramnose como extremidades não redutoras (2,3,4-tri-*O*-metil-ramnose) e de unidades de ácido glucurônico 4-*O*-substituídas (2,3-di-*O*-metil-glucose), resultados esses que são concordantes com o tipo de estrutura encontrada nos oligossacarídeos livres redutores, que apresentam unidades de ramnose terminal unidas por ligação do tipo (1→4) nas unidades de ácido glucurônico (Figura 30, página 122). Na literatura encontra-se descrito que as unidades de ramnopiranosose funcionam como extremidades não redutoras, e que estariam ligadas ao ácido glucurônico (CHARLSON *et al.*, 1990). Outros dados da literatura (SMITH F., 1939; ASPINALL *et al.*, 1965) mostram que unidades de ácido glucurônico estão presentes como extremidades não-redutoras, o que também foi verificado, no presente trabalho, pela análise de metilação (traços de ácido

glucurônico como terminal não redutor, derivado 2,3,4-tri-*O*-metil-glucose).

Na análise de metilação da goma de cajueiro de origem indiana realizada por ANDERSON & BELL (1975), através dos métodos descritos por HAWORTH (1915) e PURDIE & IRVINE (1903), com posterior quantificação dos derivados *O*-metil glicosídeos por GLC, mostraram unidades terminais não redutoras de L-Araf (9%), L-Arap (4%), L-Rha (9%), D-Glc (10%), D-Gal (25%), e outras unidades de Arap 2-*O*- (2%), Araf 2-*O*- (3%) e de Galp 3-*O*- (20%), 6-*O*- (3%), e 3,6-di-*O*-substituídos (10%). Os autores relataram que as unidades de galactose 4-*O*- e 3,4-di-*O*- e 3,4,6-tri-*O*-substituídos não foram encontrados, possivelmente por metilação incompleta.

Pelos resultados de metilação, observa-se que o polissacarídeo nativo do cajueiro de origem brasileira, tem maior conteúdo de unidades de galactose 6-*O*-substituídas (19%) e 3-6-*O*-substituídas (32%) do que o de origem indiana (3% e 10%), respectivamente. Por outro lado, o de origem indiana apresenta maior conteúdo de unidades de galactose 3-*O*-substituída (20%) do que o polissacarídeo em estudo (6%). Além disso, pode-se comparar os resultados de metilação do polissacarídeo do cajueiro (Caruaru - PE) com as informações obtidas pelos dados de RMN do polissacarídeo (Pacajus - CE), estudado por DE PAULA *et al.* (1998), em relação ao conteúdo de unidades de galactose 6-*O*-substituídas. Esses autores (DE PAULA *et al.*, 1998) não realizaram a análise de metilação do polissacarídeo do cajueiro (Pacajus - CE), porém, pelo espectro de DEPT (CH₂) concluíram que cerca de 40% das unidades de galactose estariam substituídas em O-6. Com relação a estes dados, para o polissacarídeo do cajueiro em estudo, apresentou pelos dados de metilação uma porcentagem

menor de unidades de gaitose substituídas em O-6 (19%).

Com relação aos polissacarídeos de exsudatos vegetais, existem alguns trabalhos prévios que utilizaram a espectroscopia de RMN- ^{13}C para caracterização parcial da estrutura química (DEFAYE & WONG, 1986; LÉON DE PINTO, 1991; LÉON DE PINTO *et al.*, 1995).

Com relação ao espectro de RMN- ^1H do polissacarídeo nativo de *Anacardium occidentale* (Figura 34), obteve-se na região de prótons anoméricos do espectro, os assinalamentos de δ em 5,291; 5,070; 4,913; 4,734; 4,700 (DOH); 4,493 e 4,432. Os sinais em δ 5,291 e 5,070, podem ser atribuídos a unidades em configuração anomérica α . Os sinais em δ 4,493 e 4,432, podem ser correspondente as unidades em configuração β . O sinal de H-1 da unidade de α -ramnose foi detectado em δ 4,760 (espectro de RMN- ^1H , a 70°C), bem como o sinal, em região de campo alto do espectro, em δ 1,240, característico do H-6 desta unidade. Tanto a região de H-1, como o restante do espectro não mostraram sinais bem definidos, dificultando os assinalamentos e a determinação das constantes de acoplamento, dos outros sinais de prótons do polissacarídeo. Pequenos sinais de $-\text{OCH}_3$ não foram detectados nos espectros de ^1H ($\delta \sim 3,2$), constatando a ausência do derivado 4-O-metil glucurônico.

DE PAULA *et al.* (1998) determinaram as constantes de acoplamento para ^{13}C - ^1H ($^1J_{\text{CH}}$) dos carbonos anoméricos das unidades de piranose. Estas configurações anoméricas são capazes de identificar estas unidades, uma vez que para polissacarídeos os valores de $^1J_{\text{CH}}$ para os anoméricos α e β , é de 170 MHz e 160 MHz, respectivamente (PERLIN & CASU, 1969, citado por GORIN, 1981). A configuração β foi encontrada para as unidades de galactose e ácido

glucurônico e a configuração α para unidades de ramnose, de acordo com os resultados descritos por ANDERSON *et al.* (1974). A configuração α encontrada para glucose, foi diferente da encontrado para a goma de cajueiro de origem indiana e papuana (ANDERSON & BELL, 1975). A configuração anomérica da arabinofuranose foi assinalada como α de acordo com a deslocamento químico.

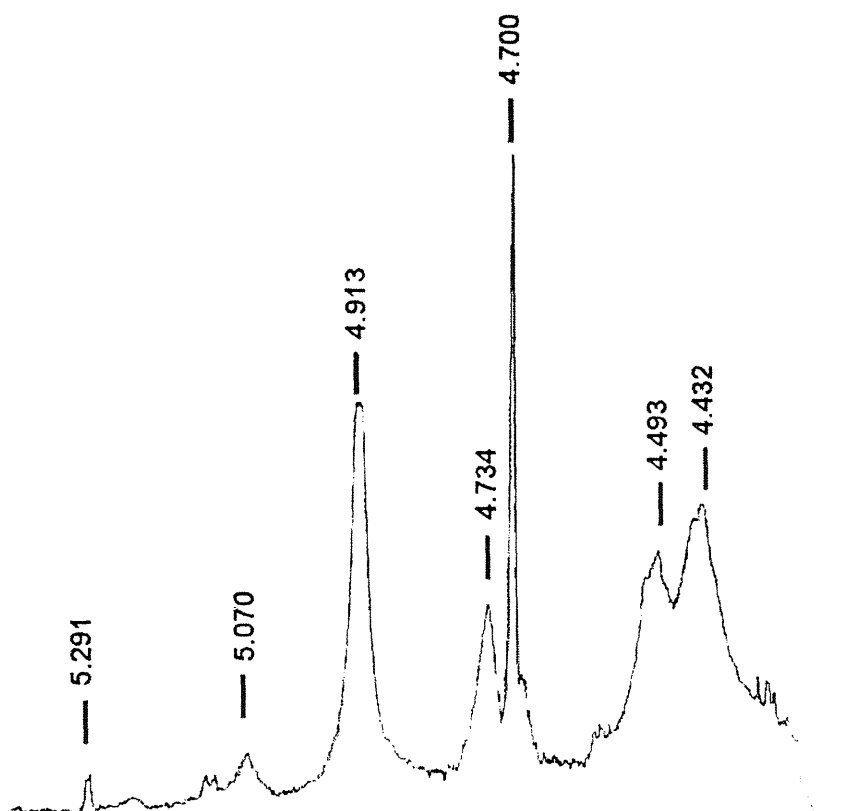


Figura 34: Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (400,13 MHz) do polissacarídeo nativo do exsudato de *Anacardium occidentale*, em D_2O , 30°C.

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

O espectro de RMN- ^{13}C do polissacarídeo nativo (PN) de *A. occidentale* (Figura 35) é complexo. Um sinal muito pequeno em δ 175,8 foi atribuído ao grupamento COOH do ácido urônico.

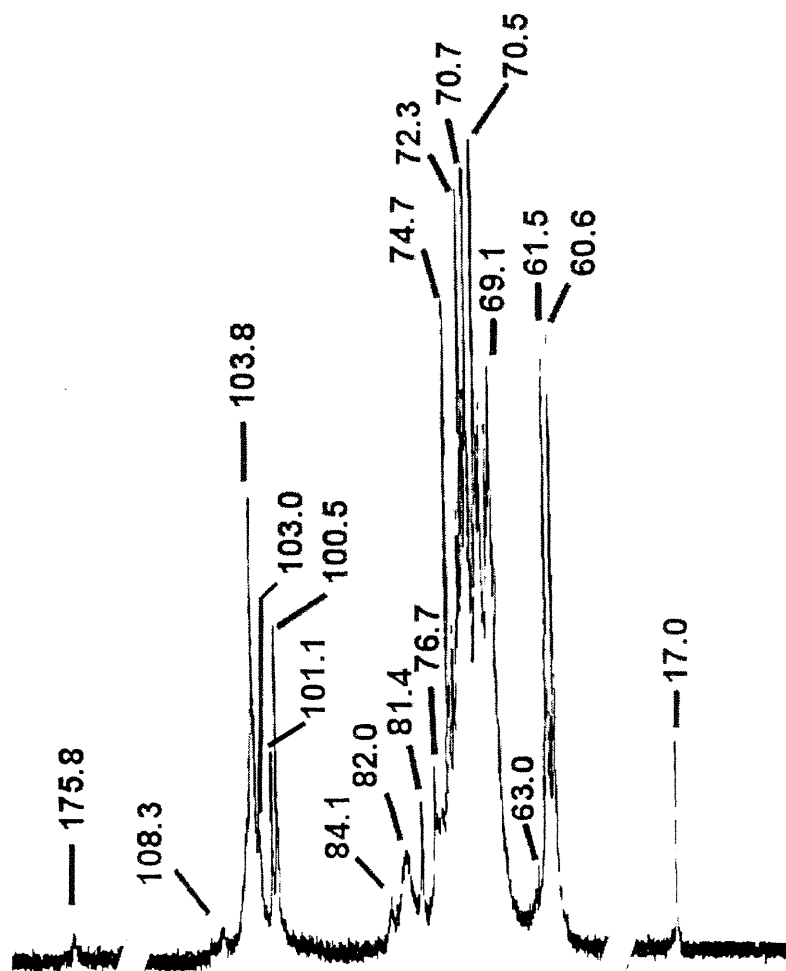


Figura 35: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) do polissacarídeo nativo do exsudato de *Anacardium occidentale*, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Na região de C-1 do espectro, apresenta-se 5 sinais com intensidades diferentes (δ 103,8 > 100,5 > 101,1 > 103,0 >> 108,3) e possíveis sobreposições de sinais. Em δ 108,3 um sinal muito pequeno atribuído a $\alpha\text{-Araf}$, e os sinais mais intensos em δ 103,8 e 100,5, atribuídos a $\beta\text{-Galp}$ e $\alpha\text{-Galp}$, respectivamente. Em δ 101,1 e 103,0, atribuídos para $\alpha\text{-Rhap}$ e $\beta\text{-Glc}p\text{A}$, respectivamente. Na região de C-2 a C-6 (δ 85 a 60), com 20 sinais, foram assinalados 3 sinais em δ 81,4 - 82,0

para β -galactose 3-*O*-substituídas e um sinal em δ 84,1 para C-4 de α -Araf (LÉON DE PINTO, 1991; DEFAYE & WONG, 1986). Em campo mais alto do espectro observa-se um sinal intenso em δ 17,0 que corresponde ao grupo $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ (C-6) da unidade de ramnose (GORIN & MAZUREK, 1975).

A ausência do sinal de $-\text{OCH}_3$ (δ ~59) em RMN- ^{13}C indica que o polissacarídeo nativo do cajueiro brasileiro não possui unidade de ácido 4-*O*-metilglucurônico, confirmando o resultado obtido no espectro de próton. Com relação, ao derivado 4-*O*-metilglucurônico, a ausência do mesmo para o PN mostra-se diferentes dos propostos para os exsudatos obtidos das espécies originadas da Índia e de Papua (ANDERSON & BELL, 1975) e da Venezuela (LÉON DE PINTO *et al.*, 1995). DE PAULA *et al.* (1998), verificaram, também, a ausência do derivado ácido 4-*O*-metilglucurônico no polissacarídeo de origem brasileira (Pacajus-CE). É importante ressaltar que a presença do derivado 4-*O*-metilglucurônico na goma de cajueiro indiana, foi relatada por ANDERSON *et al.* (1974) considerando a dosagem de grupos metoxil e os resultados de ANDERSON & BELL (1975), que verificaram a presença de um aldobiurônico que apresentou *R_f* (em cromatografia de partição em papel) idêntico ao 6-*O*-(4-*O*-metil- β -D-glucopiranosil ácido urônico)-D-galactose.

No espectro de ^{13}C -DEPT135 (CH_2 invertido) (Figura 36) não foram detectáveis sinais de C-6 de unidades de galactose, em virtude da sobreposição com sinais positivos que apresentam o mesmo deslocamento. Neste espectro observa-se a presença dos sinais invertidos em δ 61,5 e 60,5 atribuído ao CH_2 livres, das unidades de galactose (e glucose) e arabinose.

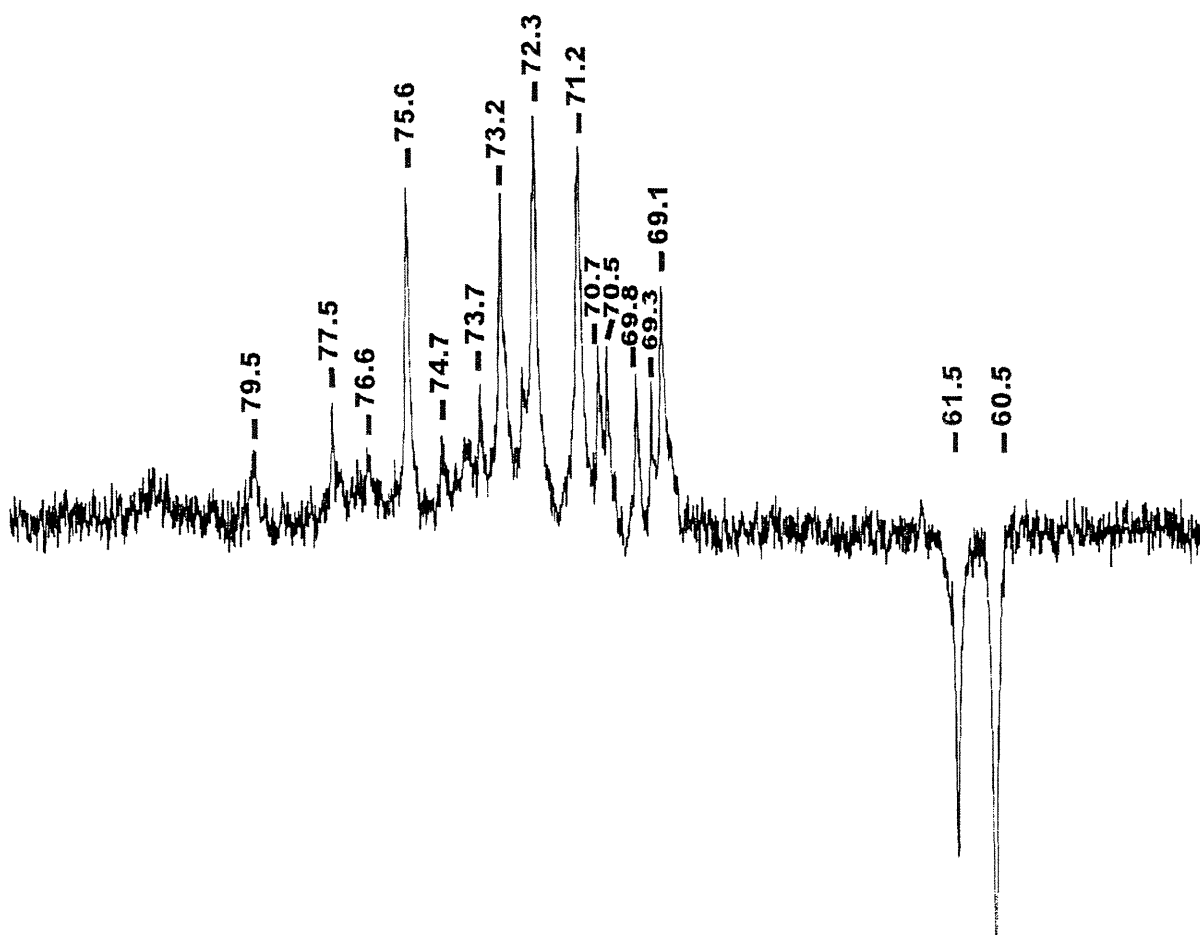


Figura 36: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 do polissacarídeo nativo do exsudato de *Anacardium occidentale*, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Pelo espectro de ^{13}C -DEPT90 ($\text{CH}-\text{CH}_3$; sinais positivos) (Figura 37), mostra-se a ausência de sinais na região entre δ 57-62, confirmando, novamente, a ausência do ácido 4-*O*-metil glucurônico no polissacarídeo do cajueiro (origem brasileira - Caruaru - PE).

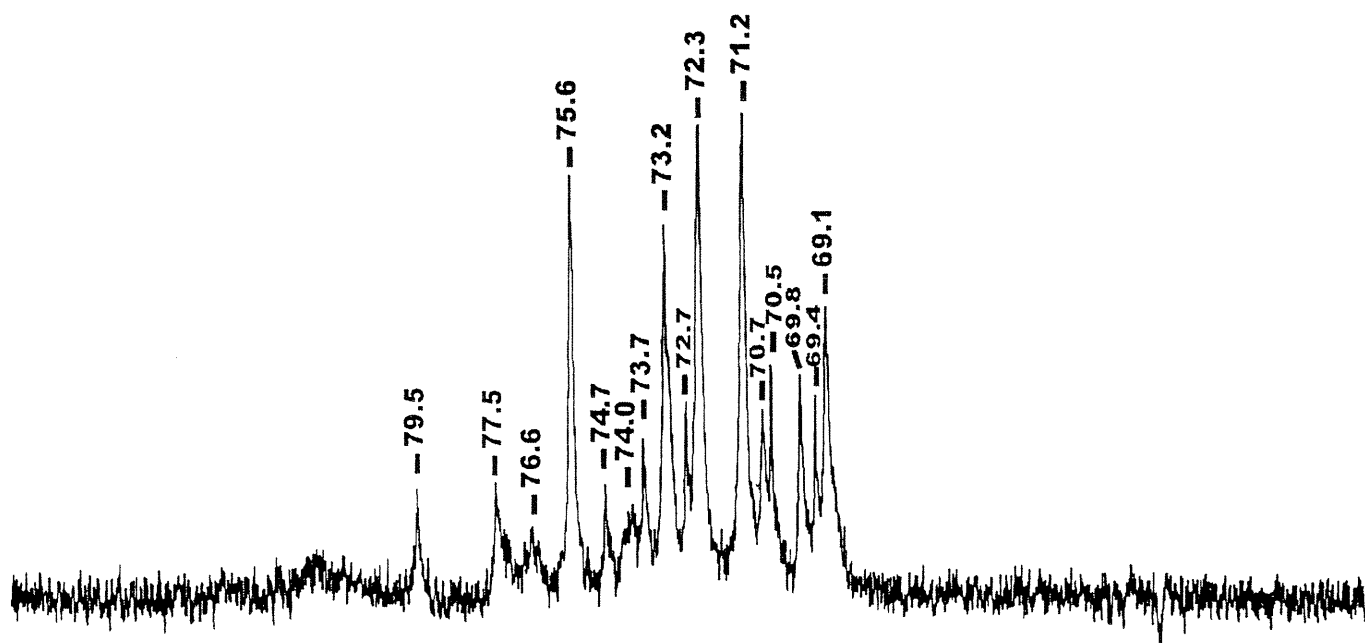


Figura 37: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT90 do polissacarídeo nativo do exsudato de *Anacardium occidentale*, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

LÉON DE PINTO *et al.* (1995) analisaram por espectroscopia de RMN- ^{13}C (75 MHz) (Figura 38) o polissacarídeo do exsudato de *A. occidentale*, de origem venezuelana, obtendo-se um espectro complexo, no qual foram assinalados a maioria dos sinais das unidades de galactose e ácido urônico. Os assinalamentos para unidade de $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow$ em δ 103,4 e δ 103,6 correspondendo ao C-1

e em δ 81,5 e δ 81,7 para C-3. Para unidade $\rightarrow 6$)- β -D-Gal-(1 \rightarrow em δ 102,5 para C-1 e em δ 68,7 para C-6. Para a unidade de β -D-GlcA-(1 \rightarrow foi assinalado para C-1 em δ 104,3 e para o derivado 4-O-Me- α -D-GlcA-(1 \rightarrow em δ 100,0 (C-1). Além disso, foi assinalado o sinal em δ 60,1 correspondendo ao 4-O-Me. Outros sinais em δ 171,5 e 175,8 foram assinalados para o C-6 dos ácidos urônicos e em δ 16,1 ao C-6 (CH₃) para as unidades de ramnose. É importante ressaltar que apesar do polissacarídeo do cajueiro de origem venezuelana ter apresentado na sua composição monossacarídica um teor alto de arabinose (31%), no espectro (Figura 38) não estão mostrados os sinais correspondentes as unidades de α -Araf (em δ 110,0 a 108), e nenhum comentário foi feito pelos autores (LÉON DE PINTO *et al.*, 1995) sobre a presença de sinais de unidades de α ou β -arabinose furanosídicas ou piranosídicas. Esses resultados mostram que, comparando-se o polissacarídeo do cajueiro de origem brasileira com o de origem venezuelana, existem diferenças com relação a presença do derivado 4-O-metil-glucurônico, além das já verificadas para composição monossacarídica e para atividade óptica. Em virtude, dos resultados apresentados por LÉON DE PINTO *et al.* (1995) sugere-se a recharacterização da estrutura química do polissacarídeo de origem venezuelana, tendo como estratégia uma análise cuidadosa na escolha dos métodos a serem utilizados, bem como na interpretação dos resultados obtidos.

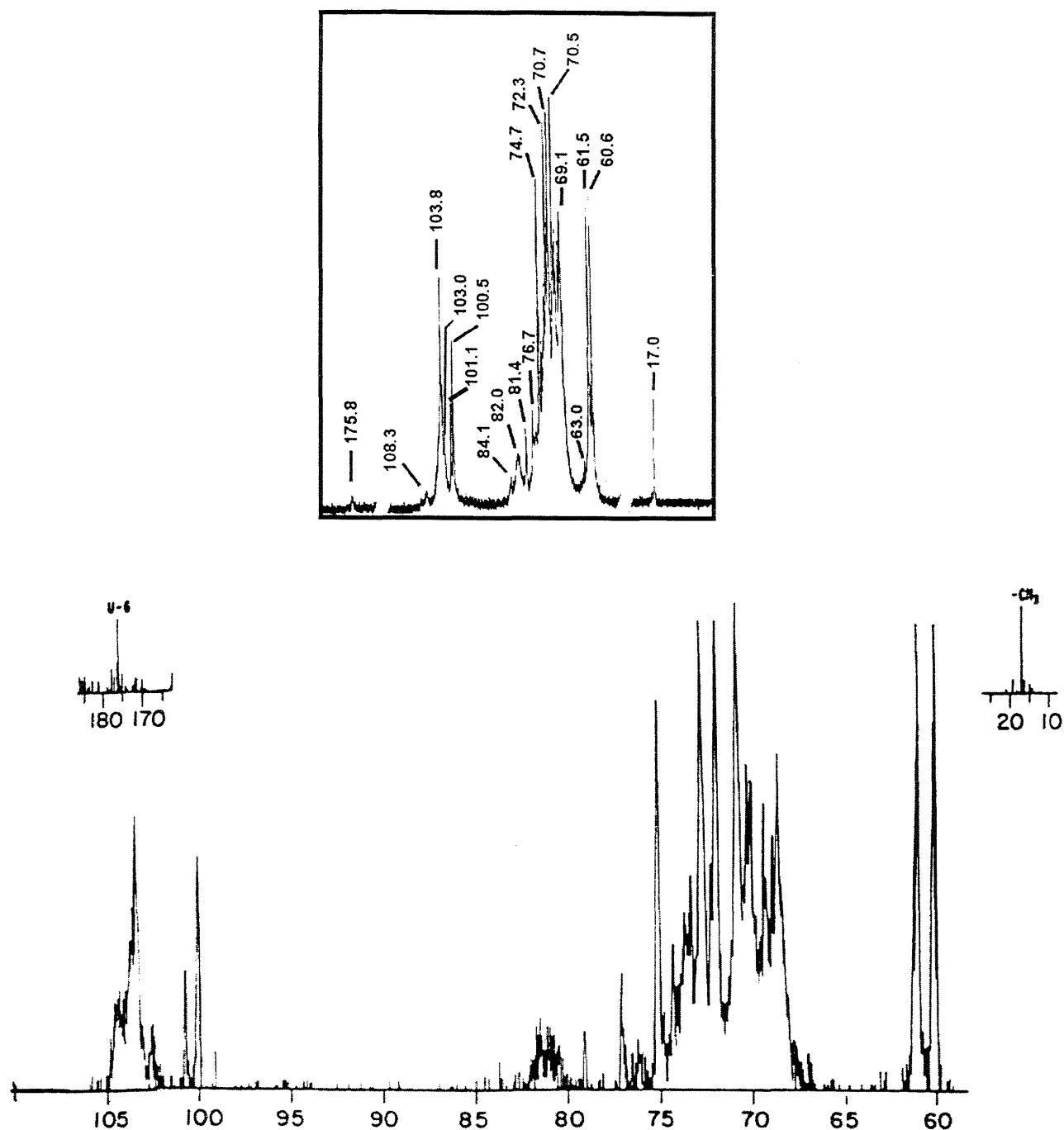


Figura 38: Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz) do polissacarídeo nativo do exsudato de *Anacardium occidentale* de origem venezuelana, em D_2O , a 37°C , obtido por LÉON DE PINTO *et al.* (1995)*.

* Padrão interno 1,4-dioxano \rightarrow 66,67 ppm. Insert: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) do polissacarídeo nativo do exsudato de *Anacardium occidentale* de origem brasileira (presente tese) em D_2O , a 30°C . Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Os resultados obtidos pela espectroscopia de RMN-¹³C do polissacarídeo de cajueiro de Caruaru (PE) foram semelhantes aos obtidos para o de Pacajus (CE) (DE PAULA *et al.*, 1998), e estão comentados a seguir. DE PAULA *et al.* (1998) relataram o espectro de RMN-¹³C (125,7 MHz) da goma intacta de *A. occidentale*, sendo que os sinais para os carbonos anoméricos foram atribuídos, com base nos dados sobre a composição monossacarídica e os deslocamentos químicos de compostos da literatura (BOCK & PEDERSON, 1983). Neste espectro foram assinalados pequenos sinais em δ 17,5 para -CH₃ de ramnose e em δ 175,7 para o grupo ácido de ácido glucurônico. As ressonâncias da região dos carbonos anoméricos (δ 90 - 110) sugerem que o polissacarídeo contém, pelo menos, seis (6) principais ligações, três como linhas bem definidas (δ 101,0, 101,6 e 103,5) e outros três aparecendo como regiões sobrepostas (δ 104-105, 105-106 e 108,5-110,5), dois pequenos sinais em δ 93 e 97,5 são consistentes com deslocamentos químicos para C1(OH) de galactose redutora em configuração α e β , respectivamente. Na região de C-2 a C-6, entre δ 60 a 85, não foram atribuídos nenhum dos sinais neste espectro de RMN-¹³C da goma intacta. Porém, para esta região, os resultados do DEPT (CH+CH₃) mostraram a ausência de sinais com deslocamentos químicos entre δ 57-62 que poderia ser atribuído a grupos metoxil, confirmando que em contraste com goma indiana (ANDERSON *et al.*, 1974) a brasileira não apresenta ácido 4-O-metil glucurônico. Além disso, no subespectro de DEPT (CH₂) foram relatados dois grupos de sinais de CH₂, um consistindo numa região de δ 61-63 e outro uma região com sobreposições de sinais em δ 69-72. Os sinais de CH₂ em δ 61-63 foram atribuídos aos grupos CH₂OH. Os sinais de CH₂ em δ 69-72 indicaram que estava presente unidades de galactose 6-O-

substituídas.

Pela análise de metilação e pela espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C do polissacarídeo nativo (PN), não obteve-se todas as informações sobre a estrutura do polissacarídeo, em virtude da complexidade da molécula. Porém, os dados de metilação, concomitante, com os dados sobre a composição monossacarídica, sugerem que este polissacarídeo é uma heterogalactana ácida, apresentando principalmente, unidades de galactose em ligações do tipo (1→3) e (1→6).

Com relação ao espectro de RMN- ^{13}C do polissacarídeo nativo (PN), pode-se ressaltar que pelas ressonâncias das unidades de β -galactopirranose e pelos dados de metilação esta unidade participa de vários tipos de ligações dentro do polissacarídeo. As ressonâncias para arabinofuranose, ramnospirranose e ácido glucurônico apareceram como sinais de melhor definição, sugerindo que cada uma dessas unidades, existem como um ambiente uniforme na goma, participando de um tipo de ligação. Excetuando-se as diferenças já relatadas, os aspectos acima comentados são concordantes com os dados obtidos para o polissacarídeo do cajueiro estudado por outros autores (ANDERSON & BELL, 1975; DE PAULA *et al.*, 1998).

Na tentativa de elucidar a estrutura completa do polissacarídeo do cajueiro fez-se necessário obter frações polissacarídicas mais simples, utilizando-se para isso da hidrólise ácida parcial e da degradação controlada de Smith. Além disso, a obtenção e a caracterização de oligossacarídeos a partir de hidrólise ácida do polissacarídeo é um modo bastante utilizado para obter moléculas mais simples, podendo contribuir na identificação dos assinalamentos dos espectros de RMN dos polissacarídeos.

A seguir estão mostrados os resultados obtidos sobre na caracterização estrutural dos polissacarídeos do cajueiro: (1) PPH (PN submetido à hidrólise ácida parcial); (2) PPHPDS1 (PPH submetido à degradação controlada de Smith); (3) PDS1 (polissacarídeo da primeira degradação controlada de Smith do PN); (4) PDS2 (polissacarídeo da segunda degradação controlada de Smith sequenciada do PN) e (5) PDS3 (polissacarídeo da terceira degradação controlada de Smith sequenciada do PN).

4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO DO EXSUDATO DE *A. occidentale* (PPH)

O polissacarídeo nativo foi parcialmente hidrolisado e submetido à análise da composição monossacarídica por CG-EM, resultando um polímero constituído por arabinose (1%), xilose (6%), manose (5%), galactose (80%), glucose (3%), além de ácido glucurônico (5%). Pela hidrólise ácida parcial obteve-se um polímero por precipitação etanólica, apresentando na sua constituição ausência de unidades de ramnose e menor conteúdo de arabinose e glucose, sugerindo que estas estariam nas extremidades terminais não redutoras do polissacarídeo nativo. Estes dados são concordantes com os obtidos na análise de metilação do polissacarídeo nativo, descrito anteriormente. O conteúdo de ácido glucurônico não foi alterado pela hidrólise ácida parcial nas condições já descritas, constatando a resistência à hidrólise das ligações entre unidades de ácido urônico e monossacarídeos neutros (CHAPLIN, 1994).

O polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPH) apresentou uma rotação específica de $[\alpha]_D^{25} = + 20^\circ$, próxima ao obtido por ANDERSON & BELL (1975), para o polissacarídeo parcialmente hidrolisado do cajueiro (Índia) que apresentou um valor de $+ 29,1^\circ$.

A análise de metilação do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (Tabela XII, página 168), mostrou unidades terminais não redutoras de Glcp (6%) e Galp (35%), além de unidades de Galp 3-*O*- (9%), 4-*O*- (5%), 6-*O*- (17%) e 3,6-di-*O*-substituídas (28%). Além disso, na análise do polissacarídeo (PPH) permetilado submetido a redução com LiAlD₄ mostrou a presença de unidades de ácido glucurônico como unidades terminais não redutoras (traços de derivado 2,3,4-tri-*O*-metil-glucose). Como descrito anteriormente, no polissacarídeo nativo as unidades terminais não redutoras eram constituídas por arabinose, ramnose, ácido glucurônico, glucose e galactose, após esta molécula ser submetida à hidrólise ácida parcial, foram removidas todas as unidades de ramnose e parte das unidades de arabinose e glucose, verificado tanto pela análise da composição monossacarídica como pela metilação. Além disso, o aumento verificado de 19% para 35% do derivado 2,3,4,6-tetra-*O*-metil galactose (extremidade não redutora), indica que as unidades de ramnose, arabinose e glucose estariam ligadas a unidades de galactose, no polissacarídeo nativo (PN).

ANDERSON & BELL (1975), analisaram a goma de cajueiro (origem indiana) após hidrólise ácida parcial em H₂SO₄ 0,005 M, por 96 h, a 100°C, e obtiveram a goma degradada A, sendo que esta foi caracterizada pela composição monossacarídica e análise de metilação. Os resultados obtidos por ANDERSON & BELL (1975) foram semelhantes aos relatados na presente tese, principalmente,

com relação a remoção das unidades de ramnose e parte das unidades de arabinose pela hidrólise ácida parcial e pela presença de 35% de unidades terminais não redutoras de Galp (35%). Porém, pela hidrólise ácida parcial não foi removida parte das unidades de glucose e a análise de metilação da goma degradada A apresentou 24% e 6% de unidades de Galp 3-O- e 6-O-, respectivamente, valores estes diferentes do encontrado para o PPH.

O espectro de RMN-¹³C (100,61 MHz) do PPH (Figura 39) apresenta regiões complexas de C-1, com sinais em δ 103,3 (maior), 104,4, 103,9, 103,7, 102,7, 100,1 e de C-3 O-substituída, com sinais em δ 81,9 a 80,9. Outros sinais menores, na região de C-1, foram assinalados em δ 92,3, 96,5, 96,3. Podem ser atribuídos a unidade de galactose redutora, os sinais em δ 92,3 ao anômero α e δ 96,5 e 96,3 ppm para os anômeros β . Além disso, o sinal em δ 172,4 foi atribuído ao COOH da unidade de ácido urônico.

A análise de espectroscopia de RMN do polissacarídeo PPH, mostraram que esta molécula é complexa, como verificado pela região de carbonos anoméricos do respectivo espectro. Comparando os espectros de RMN-¹³C do polissacarídeo nativo com o do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (Figura 39), tem-se diferenças pronunciadas, na região de C-1 (principal sinal em δ 103,8 para PN e em δ 103,3 para PPH), além do sinal em δ 61,0 intenso (C-6 livre de galactose) presente no espectro do PPH.

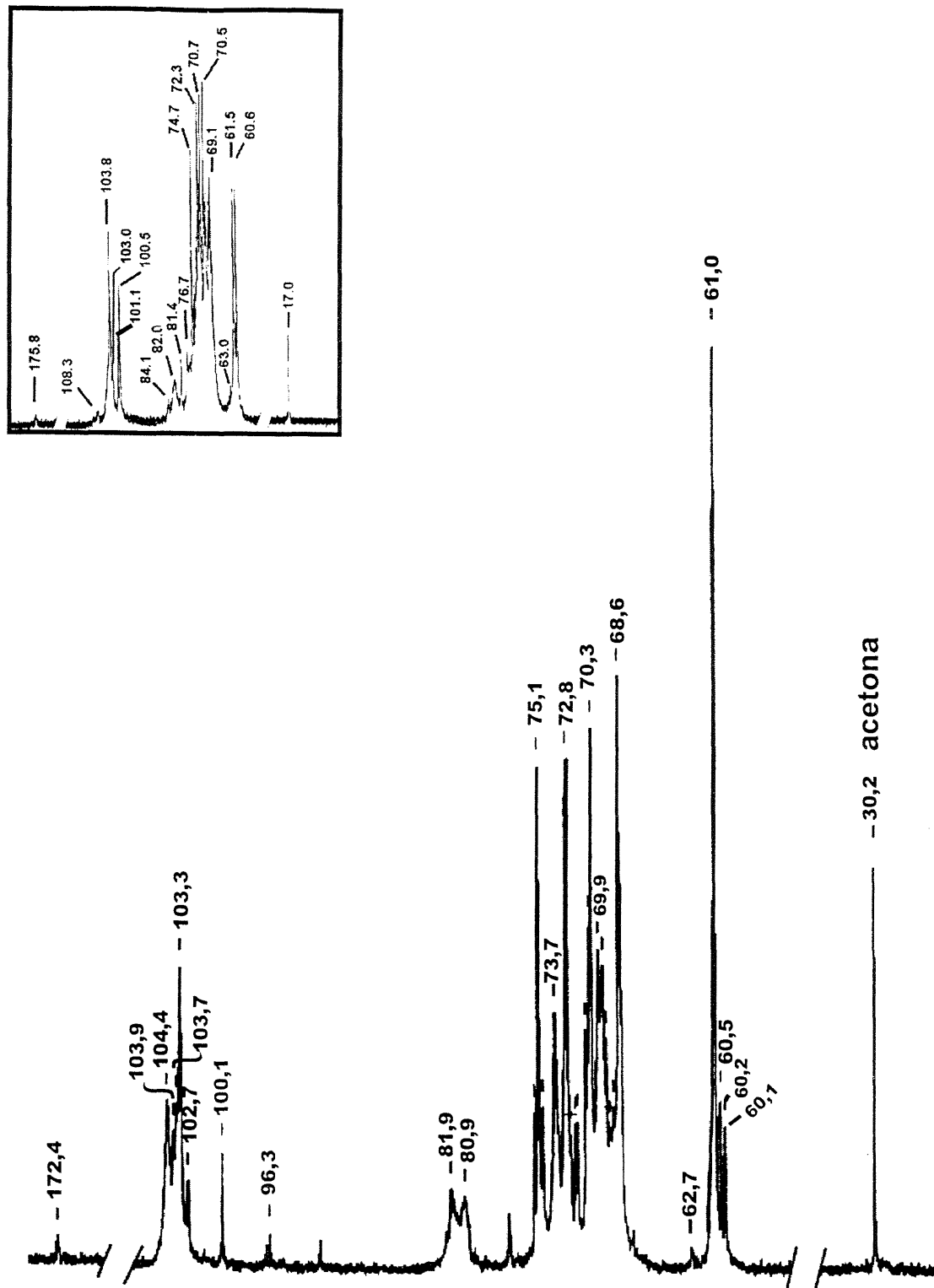


Figura 39: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido a partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato de *Anacardium occidentale* (PPH), em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. Insert: Espectro de ^{13}C -RMN do polissacarídeo nativo (PN).

Os sinais invertidos no ^{13}C -DEPT135 (Figura 40) assinalados em δ 61,0 (maior) e em δ 60,5, 60,2, 60,1, 62,7 (menores), correspondendo a CH_2OH (ou CH_2) (C-6 ou C-5) de unidades de galactose, glucose e arabinose. Além dos sinais sobrepostos em δ ~69,0, não sendo possível atribuir os sinais para C-6 de galactose substituído.

Os resultados relatados por DE PAULA *et al.* (1998), sobre a composição monossacarídica e a análise de RMN- ^{13}C do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (Pacajus - CE) foram semelhantes aos resultados apresentados na presente tese.

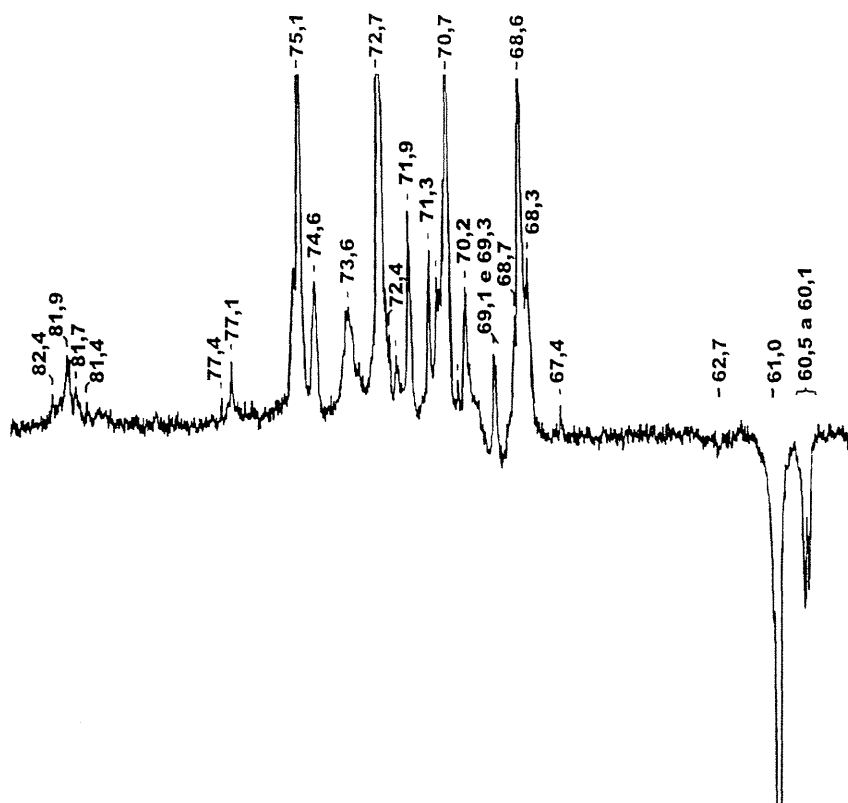


Figura 40: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 do polissacarídeo obtido a partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato de *Anacardium occidentale* (PPH), em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DA DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DO POLISSACARÍDEO PARCIALMENTE HIDROLISADO (PPHDS1)

O polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPH) foi submetido à degradação controlada de Smith (Figura 05, página 53). Após a oxidação com metaperiodato de sódio e redução com boroidreto de sódio, obteve-se o poliálcool, e uma alíquota deste, foi hidrolisada e analisada por CG-EM na forma de acetato de alditóis, obtendo-se como resultado glicerol, treitol, arabinitol e galactitol, na proporção molar de 76:2:1:21. O glicerol indica a presença de hexoses ou pentoses com unidades terminais não-redutoras, e também ligações do tipo (1→6) e (1→2) para hexoses e do tipo (1→5) para pentoses (ASPINALL, 1982c). A presença de galactose, pode indicar a presença de ligação do tipo (1→3), a qual é resistente a oxidação com periodato de sódio. O restante do poliálcool foi submetido à hidrólise parcial, nas condições já descritas, obtendo-se por precipitação etanólica, o polissacarídeo PPHDS1 (rendimento de 30%), o qual foi analisado por CG-EM, espectroscopia de RMN-¹³C. Este polissacarídeo apresentou um valor de $[\alpha]_D^{25} +34^\circ$.

Na análise da composição monossacarídica, por CG-EM, do polissacarídeo PPHDS1, este apresentou-se constituído por galactose, arabinose e glucose, na proporção molar de 93:6:1. O espectro de RMN-¹³C demonstra a ausência de sinais correspondentes a açúcares ácidos nesta amostra.

O espectro de RMN-¹³C do PPHDS1 (Figura 41), apresentou 6 sinais principais, em δ 103,9; 82,0; 74,7; 70,3; 68,4 e 61,0, os quais foram atribuídos

para C-1, C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6 da unidade de β -D-Galp, caracterizando-se como uma cadeia principal de β -galactopirranose (1 \rightarrow 3) ligada. Os assinalamentos foram baseados na estrutura de β -D-Galp-[(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp]₄-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp caracterizada por COLLINS *et al.*, 1981. Outros sinais de menor intensidade, na região de C-1, foram assinalados em δ 104,1, 102,3 e 100,4. O sinal em δ 102,3 pode ser atribuído para β -L-arabinopirranose. O sinal em δ 100,4 pode ser atribuído para α -D-glucopirranose.

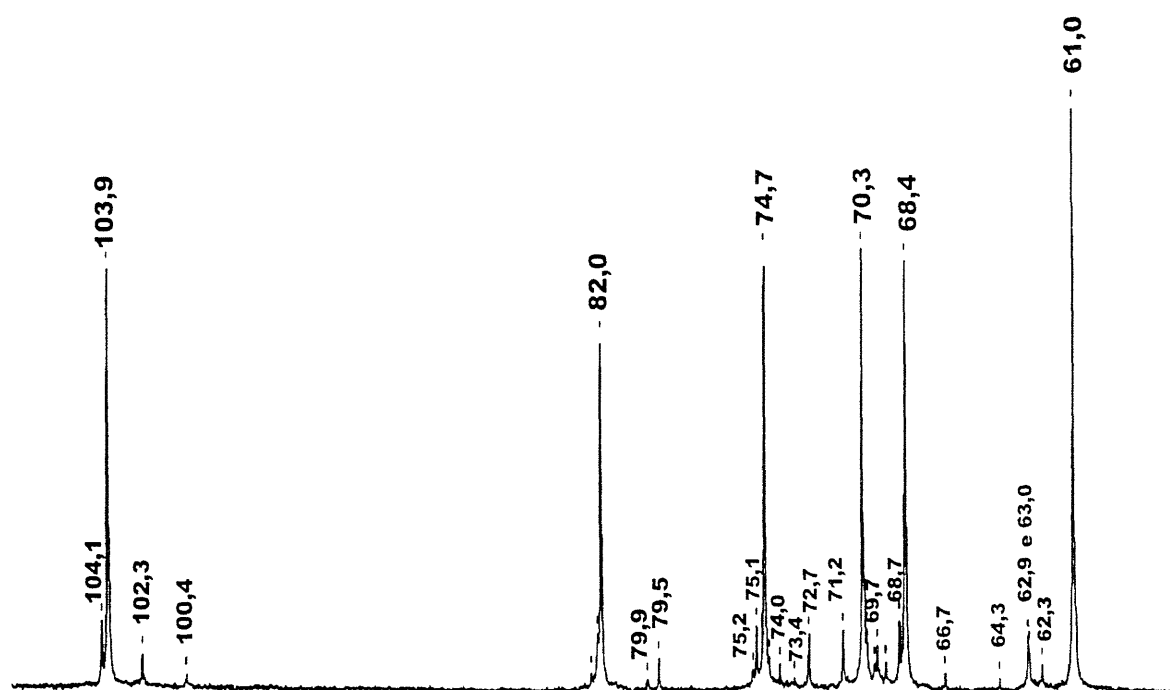


Figura 41: Espectro de RMN-¹³C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido a partir da degradação controlada de Smith do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPHDS1), em D₂O, a 30°C.

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

O espectro de ^{13}C -DEPT135 do PPHDS1 (Figura 42), mostrou a inversão dos sinais δ em 64,3 (C-5, β -L-Arap); 62,9; 63,0 (menores); 61,0 (maior). A intensidade do último sinal descrito, além da ausência de sinal de C-6 O-substituído (região $\delta \sim 69,0$), confirmam a presença de uma cadeia principal formada por unidades de galactopirranose unidas por ligação do tipo (1 \rightarrow 3).

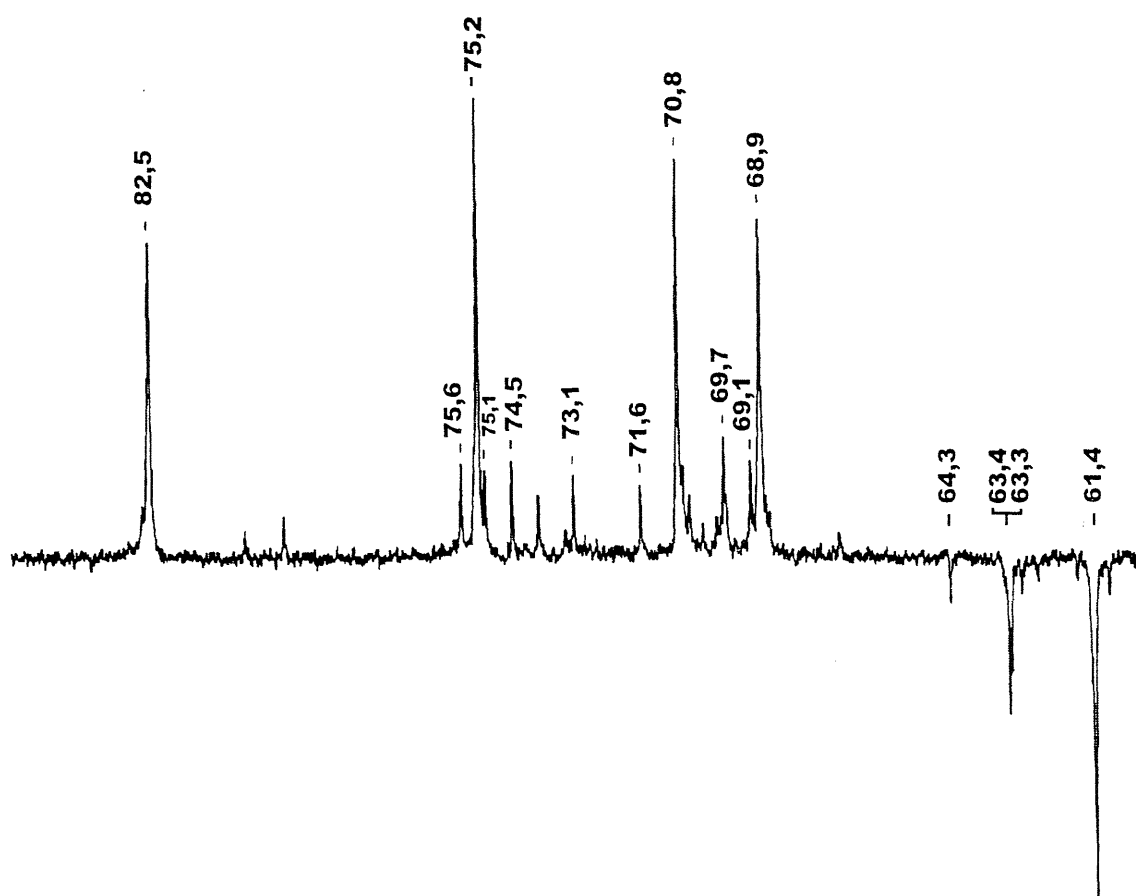


Figura 42: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 do polissacarídeo obtido a partir da degradação controlada de Smith do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PPHDS1), em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Os resultados descritos por ANDERSON & BELL (1975) para o polissacarídeo do cajueiro (origem indiana) parcialmente hidrolisado submetido a degradação controlada de Smith (goma degradada B), foram semelhantes aos relatados na presente tese. A goma degradada B apresentou um valor de $[\alpha]_D^{25^\circ} = +38,3^\circ$, sendo constituída apenas por galactose. A análise de metilação deste polissacarídeo mostrou a presença de 70% do derivado 2,4,6-Me₃-galactose, indicando a presença de uma cadeia principal de β -D-galactose (1 \rightarrow 3) ligada, resultado este concordante com a análise do espectro de RMN-¹³C do PPHDS1 (Figura 41).

4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS PELA DEGRADAÇÃO CONTROLADA SEQUENCIADA DE SMITH: PDS1, PDS2 E PDS3

O polissacarídeo nativo (PN) foi submetido a degradação controlada de Smith sequenciada (Figura 06, página 56). Obteve-se os poliálcoois 1, 2 e 3, respectivos, à primeira, segunda e terceira degradações controladas de Smith sequenciadas. A partir de uma alíquota de cada um, realizou-se a hidrólise ácida total e a análise em CG-EM, na forma de acetatos de alditóis. Os resultados obtidos mostraram que os poliálcoois 1, 2 e 3 apresentam-se constituídos por glicerol, arabinose, e galactose, nas proporções de 75:3:22, 69:4:27 e 4:2:94, respectivamente. O glicerol indica a presença de hexoses ou pentoses com unidades terminais não-redutoras, e também ligações do tipo (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 2) para hexoses e do tipo (1 \rightarrow 5) para pentoses (ASPINALL, 1982c). A presença de

galactose, pode indicar a presença de ligação do tipo (1→3) a qual é resistente a oxidação com periodato de sódio.

Seguindo o procedimento da degradação controlada de Smith sequenciada, obteve-se os polissacarídeos PDS1, PDS2 e PDS3, a partir da primeira, segunda e terceira degradações controladas de Smith. Os resultados sobre a composição monossacarídica do PDS1, mostrou que este polímero é constituído de galactose, arabinose, xilose, manose e galactose na proporção molar de 90:8:1:1 e apresenta um valor de $[\alpha]_D^{25^\circ} = +43^\circ$. Os polissacarídeos PDS2 e PDS3, apresentam-se constituídos por galactose e arabinose, nas proporções de 92:8 e 97:3, respectivamente. O valor de $[\alpha]_D^{25^\circ}$ verificado para PDS2 foi de $+40^\circ$. Não foi determinada a rotação ótica específica do PDS3.

Os resultados sobre o PDS1, mostram um polímero com ausência de unidades de ramnose e ácido glucurônico, provavelmente pela remoção destas unidades durante o processo de degradação. Confirmando que estas unidades estariam participando de ramificações na estrutura do tipo α -L-Rhap-(1→4)- $\alpha\beta$ -D-GlcpA-.

Na Tabela XI compara-se os resultados obtidos sobre a composição monossacarídica e os dados de $[\alpha]_D^{25^\circ}$ dos polissacarídeos: PN, PPH, PPHDS1, PDS1, PDS2 e PDS3.

Tabela XI: Composição monossacarídica e $[\alpha]_D^{25^\circ}$ obtidos para os polissacarídeos PN, PPH, PPHDS1, PDS1, PDS2 e PDS3.

Polissacarídeos						
Monossacarídeos Constituintes (%)	PN	PPH	PPHDS1	PDS1	PDS2	PDS3
Ácido glucurônico	5	5	-	-	-	-
Arabinose	4	1	6	8	8	3
Galactose	82	80	93	90	92	97
Glucose	6	3	1	-	-	-
Manose	-	5	-	1	-	-
Ramnose	2	-	-	-	-	-
Xilose	1	6	-	1	-	-
$[\alpha]_D^{25^\circ}$	+21°	+20°	+34°	+43°	+40°	nd

PN → polissacarídeo nativo, PPH → polissacarídeo nativo submetido à hidrólise ácida parcial, PPHDS1 → PPH submetido à degradação controlada de Smith, PDS1, PDS2 e PDS3 → polissacarídeos obtidos a partir da primeira, segunda e terceira degradações controladas sequenciadas de Smith do polissacarídeo nativo. nd: não determinado.

A análise de metilação do polissacarídeo obtido da primeira degradação controlada de Smith (PDS1) mostrou unidades terminais não redutoras de Glcp (3%), e Galp (11%) e com unidades de Galp 3-*O*- (67%), 4-*O*- (2%), 6-*O*- (3%), e 3,6-di-*O*- substituídas (14%) (Tabela XII, página 168).

Pelos dados de metilação, a presença do principal derivado 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose, mostra que o PDS1 apresenta uma cadeia de galactose formadas por ligações (1→3). Porém, neste polissacarídeo, tem-se, ainda a presença de unidades de galactose substituídas em 6-*O* e 3,6-di-*O*-substituídas. Em relação ao polissacarídeo nativo, pelo procedimento de deagração controlada de Smith, foi possível obter um polissacarídeo menos ramificado, conforme verificado pela diminuição (em %) dos derivados parcialmente metilados de galactose: 2,3,4,6-tetra-*O*-metil, 2,3,6-tri-*O*-metil, 2,3,4-tri-*O*-metil e 2,4-di-*O*-metil.

Tabela XII: Análise de metilação dos polissacarídeos: nativo (PN), parcialmente hidrolisado (PPH) e do obtido a partir da primeira degradação controlada de Smith (PDS1)

acetato de alditóis O-metilados	tempo de retenção em s, DB 210*	acetato de alditóis O-metilados obtidos a partir dos polissacarídeos metilados** (moles%)					Tipo de ligação
		PN	PPH	PDS1	PN red.	PPH red.	
2,3,5-Me ₃ -Ara	454	2	-	-	-	-	extrem. não redutora
2,3,4-Me ₃ -Rha	461	2	-	-	-	-	extrem. não redutora
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	518	10	6	3	7	5	extrem. não redutora
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	532	19	35	11	17	26	extrem. não redutora
2,4,6-Me ₃ -Gal	605	6	9	67	10	13	3-O-Gal
2,3,6-Me ₃ -Gal	645	10	5	2	6	5	4-O-Gal
2,3,4-Me ₃ -Glc	666	-	-	-	tr.	tr.	6-O-Glc ou extrem. não redutora de GlcpA
2,3,4-Me ₃ -Gal	707	19	17	3	26	22	6-O-Gal
2,3-Me ₂ -Glc	836	-	-	-	1	-	4,6-di-O-Glc ou 4-O-GlcpA
2,4-Me ₂ -Gal	864	32	28	14	33	29	3,6-di-O-Gal

* Foram utilizadas 2 colunas, em virtude da sobreposição dos isômeros de Rha, Ara, e Gal. Em OV-225, ocorre sobreposição dos isômeros 2,3,5-Me₃-Ara (447 s) e 2,3,4-Me₃-Rha (448 s). e também dos isômeros de 2,4-Me₂-Ara (545 s), 3,4-Me₂-Ara (542 s), e 2,3,4,6-Me₄-Gal (542 s). Sendo possível identificar os derivados 2,5-Me₂-Ara (509 s), 3,5-Me₂-Ara (499 s), e 2,3-Me₂-Ara (537 s). Em DB-210, 2,5-Me₃-Ara (533 s) e 2,3,4,6-Me₄-Gal (533 s) estão sobrepostos. Podendo identificar os derivados 3,5-Me₂-Ara (519 s), 2,3-Me₂-Ara (577 s), 3,4-Me₂-Ara (571 s), 2,4-Me₂-Ara (558 s), 2,3,4,6-Me₄-Gal (533 s), 2,3,5-Me₃-Ara (462 s), e 2,3,4-Me₃-Rha (469 s). **PN → polissacarídeo nativo, PPH → polissacarídeo nativo submetido à hidrólise ácida parcial, PDS1 → polissacarídeo obtido a partir da primeira degradação controlada de Smith do polissacarídeo nativo, PN red. → polissacarídeo nativo após redução com lítio alumínio deuterado, PPH red → polissacarídeo nativo submetido à hidrólise ácida parcial após redução com lítio alumínio deuterado. tr. → < 1%.

ANDERSON & BELL (1975) submeteram o polissacarídeo de cajueiro nativo de origem indiana, a 5 sucessivas degradações de Smith, obtendo os polissacarídeos I a V. O polissacarídeo I com $[\alpha]_D^{25^\circ}$ de $+41^\circ$, apresentou-se constituído por galactose, arabinose e ácido glucurônico, nas proporções de 76:22:1,8, respectivamente. A análise de metilação do polissacarídeo I, mostrou como principais derivados metilados, 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose (37%), além dos derivados 2,3,4,6,-tetra-*O*-metil-galactose (17%), 2,3,5-tri-*O*-metil-arabinose (12%), 3,5-di-*O*-metil-arabinose (11%) e 2,4-di-*O*-metil-galactose (8%). Outros derivados de galactose, arabinose e ácido glucurônico apareceram em quantidades inferiores a 4%. A presença do derivado 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose, indica uma cadeia de galactose (1→3) ligada e a do derivado 3,5-di-*O*-metil-arabinose, indica que as unidades de arabinose participam de ligações do tipo (1→2). Comparando-se os resultados obtidos por ANDERSON & BELL (1975) para o polissacarídeo I com os relatados para o PDS1, verifica-se que ambos polissacarídeos apresentam uma cadeia principal de galactose unidas por ligações (1→3). Os polissacarídeos II ($[\alpha]_D^{25^\circ} +39,9^\circ$) e III ($[\alpha]_D^{25^\circ} +35,2^\circ$) apresentaram constituídos galactose e arabinose, nas proporções molares de 90:10 e 97:3, respectivamente (ANDERSON & BELL, 1975), resultados similares aos encontrados para os polissacarídeos PDS2 e PDS3.

O espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) do PDS1 (Figura 43), obtido pela primeira degradação controlada de Smith, apresentou 6 sinais proeminentes (correspondendo a 95% dos sinais), em δ 105,5 (C-1), 84,3 (C-3), 71,0 (C-2), 68,9 (C-4), 75,4 (C-5) e 61,4 (C-6), referente aos carbonos de uma cadeia principal de β -Galp ligadas por (1→3). O sinal de C-6 não substituído foi confirmado pelo

espectro de RMN de ^{13}C -DEPT135 (Figura 44). Os assinalamentos foram baseados nos resultados de COLLINS *et al.* (1981). Neste espectro não há sinais correspondentes a unidades de α -arabinofuranose, sugerindo que as unidades de arabinose estariam na forma piranosídica. Além disso, tem-se sinais menores em δ 105,9, 105,8 referentes as unidades de β -D-galactose 3,6-di-*O*-substituídas. Além dos sinais em δ 104,3 e 101,3, que podem ser atribuídos ao C-1 de unidades de β -L-Arap e α -D-Glcp. E os sinais em δ 84,8, 84,7 e 84,5 atribuídos ao C-3 de unidades de galactose 3-*O*-substituídas e outro menor em δ 80,6, possivelmente, atribuídos ao C-3 ou C-4 de unidades de galactose *O*-substituídas.

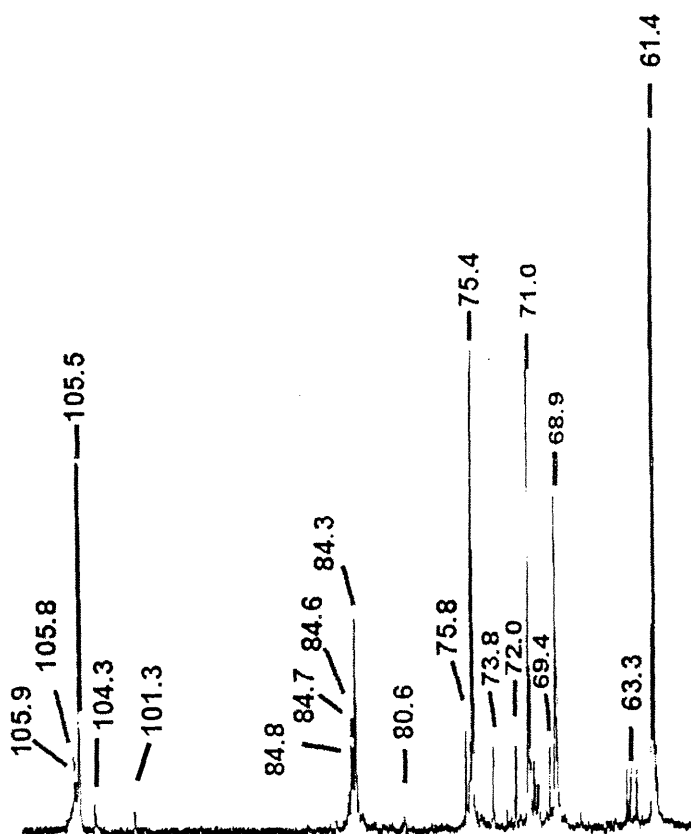


Figura 43: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido da primeira degradação controlada de Smith do PN (PDS1), em D_2O com NaOH a 5% (p/v), a 30°C.

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

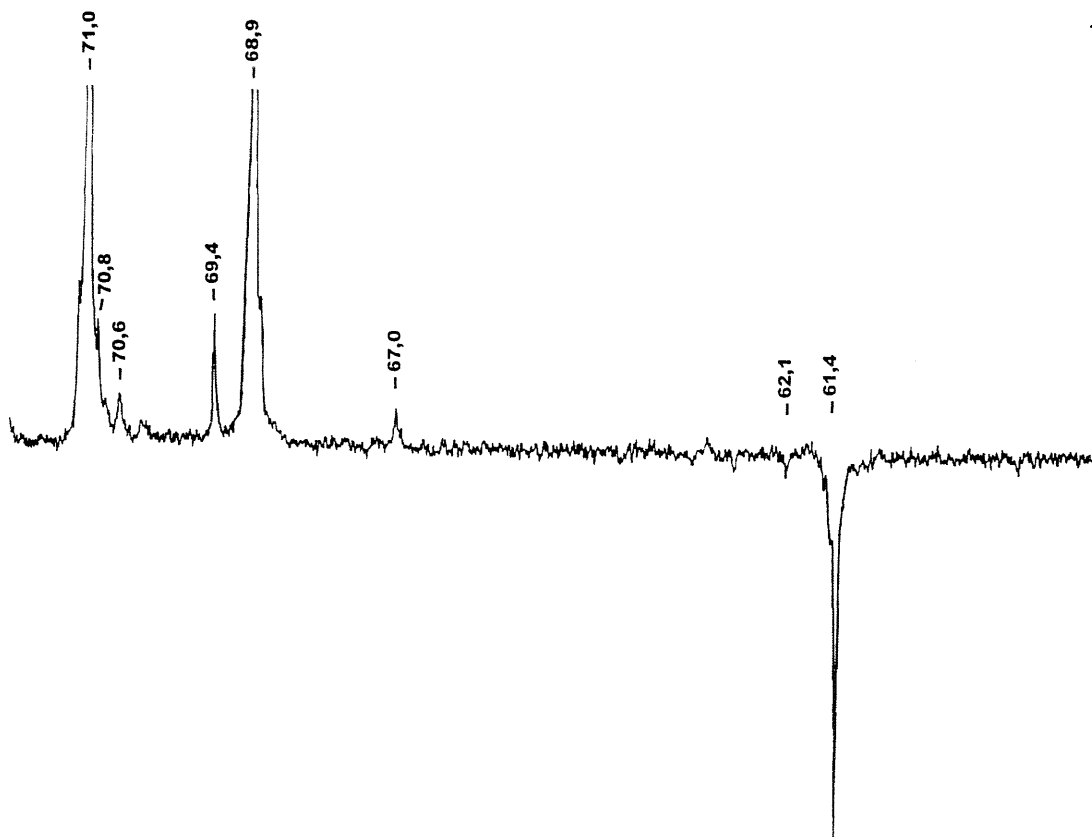


Figura 44: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 do polissacarídeo obtido da primeira degradação controlada de Smith do PN (PDS1), em D_2O com NaOH a 5% (p/v), a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Os espectros de RMN- ^{13}C (Figuras 45 e 46) dos polissacarídeos da segunda e terceira degradações controladas de Smith (PDS2 e PDS3), foram similares, ao descrito para PDS1. O PDS2 apresenta os 6 sinais principais em δ 105,6 (C-1), 71,0 (C-2), 84,4 (C-3), 68,9 (C-4), 75,4 (C-5) e 61,4 (C-6) e o PDS3 os sinais em δ 105,4 (C-1), 70,9 (C-2), 84,2 (C-3), 68,9 (C-4), 75,3 (C-5) e 61,4 (C-6), para os carbonos da unidade de D-galactopiranosose (1 \rightarrow 3) ligada.

Os dados de ^{13}C -RMN, mostrando uma cadeia de galactopiranosose com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) são concordantes com os dados de metilação, o qual apresentou como principal derivado metilado o 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose, correspondendo a unidade de galactose 3-*O*-substituídas.

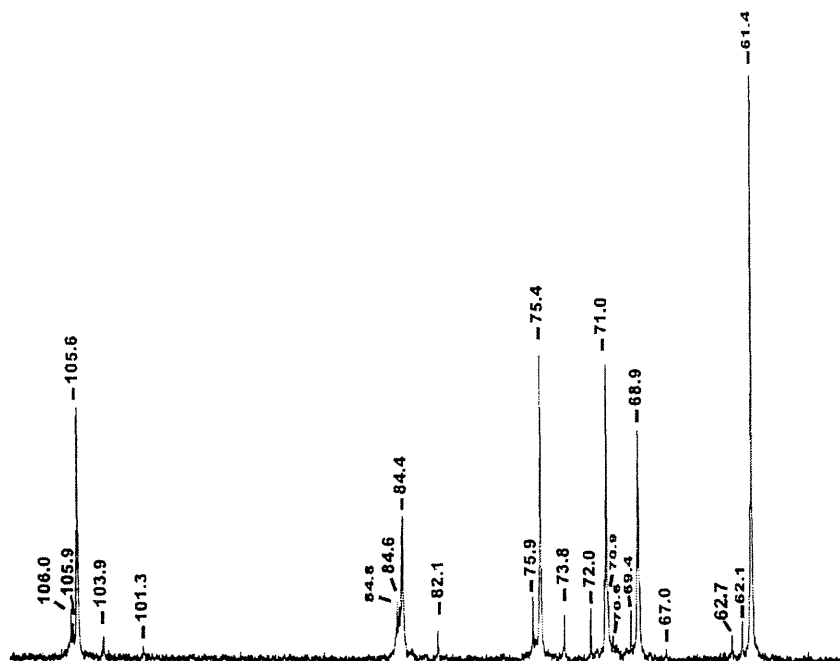


Figura 45: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido da segunda degradação controlada de Smith sequenciada (PDS2), em D_2O com NaOH a 5% (p/v), a 30°C.

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.



Figura 46: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) do polissacarídeo obtido da terceira degradação controlada de Smith sequenciada (PDS3), em D_2O com NaOH a 5% (p/v), a 30°C.

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

DE PAULA *et al.* (1998), obtiveram um espectro de RMN- ^{13}C do polissacarídeo do cajueiro (Pacajus-CE) submetido à degradação controlada de Smith, muito mais simples do que o polissacarídeo intacto. Seis principais sinais foram observados em δ 61,9, 69,5, 71,4, 75,8, 82,9 e 104,8, todos com a mesma intensidade. O espectro mostra um principal sinal em δ 61,9 (assinalado para C-6 como CH_2OH) e os outros quatros sinais na região de δ 69-83 (C-2 a C-5), todos com a mesma intensidade do carbono anomérico C-1 em δ 104,8, indicando que as ligações (1 \rightarrow 6) das unidades de galactose foram quebradas. Os dados da literatura mostram que os deslocamentos químicos dos quatro principais sinais em δ 69-83 são consistentes com uma cadeia principal de unidades de galactose ligadas em (1 \rightarrow 3), sendo os assinalamentos de C-2 a C-5, como: C-4 = δ 69,5; C-2 = δ 71,4; C-5 = δ 75,8; C-3 = δ 82,9. Esses autores não descrevem a composição monossacarídica desta fração, e não realizaram análise de metilação dos polissacarídeos nativo, parcialmente hidrolisado e do obtido por degradação controlada de Smith.

Com relação aos resultados obtidos por DE PAULA *et al.* (1998) para o polissacarídeo de cajueiro obtido pela degradação controlada de Smith, foram similares aos encontrados para os polissacarídeos PDS1, PDS2 e PDS3, obtidos neste trabalho. O valor obtido para C-1 de D-galactose-(1 \rightarrow 3), na presente tese, foi de δ 105,5 superior ao encontrado por DE PAULA *et al.* (1998), que foi de δ 104,8. Provavelmente, esta diferença deve-se aos solventes utilizados na obtenção do espectro de RMN (COLSON *et al.*, 1974).

A fim de comparar os resultados obtidos para o polissacarídeo nativo e seus derivados, na Figura 47 estão mostradas as regiões de C-1 dos espectros

de RMN- ^{13}C dos polissacarídeos nativo (PN), parcialmente hidrolisado (PPH), parcialmente hidrolisado submetido à degradação controlada de Smith (PPHPDS1), polissacarídeo da obtido da primeira degradação controlada de Smith (PDS1), polissacarídeo da obtido da segunda degradação controlada de Smith (PDS2), polissacarídeo da obtido da terceira degradação controlada de Smith (PDS3). A Tabela XIII relaciona os sinais, da região de C-1, obtidos nos espectros de RMN- ^{13}C , e os assinalamentos dos respectivos carbonos.

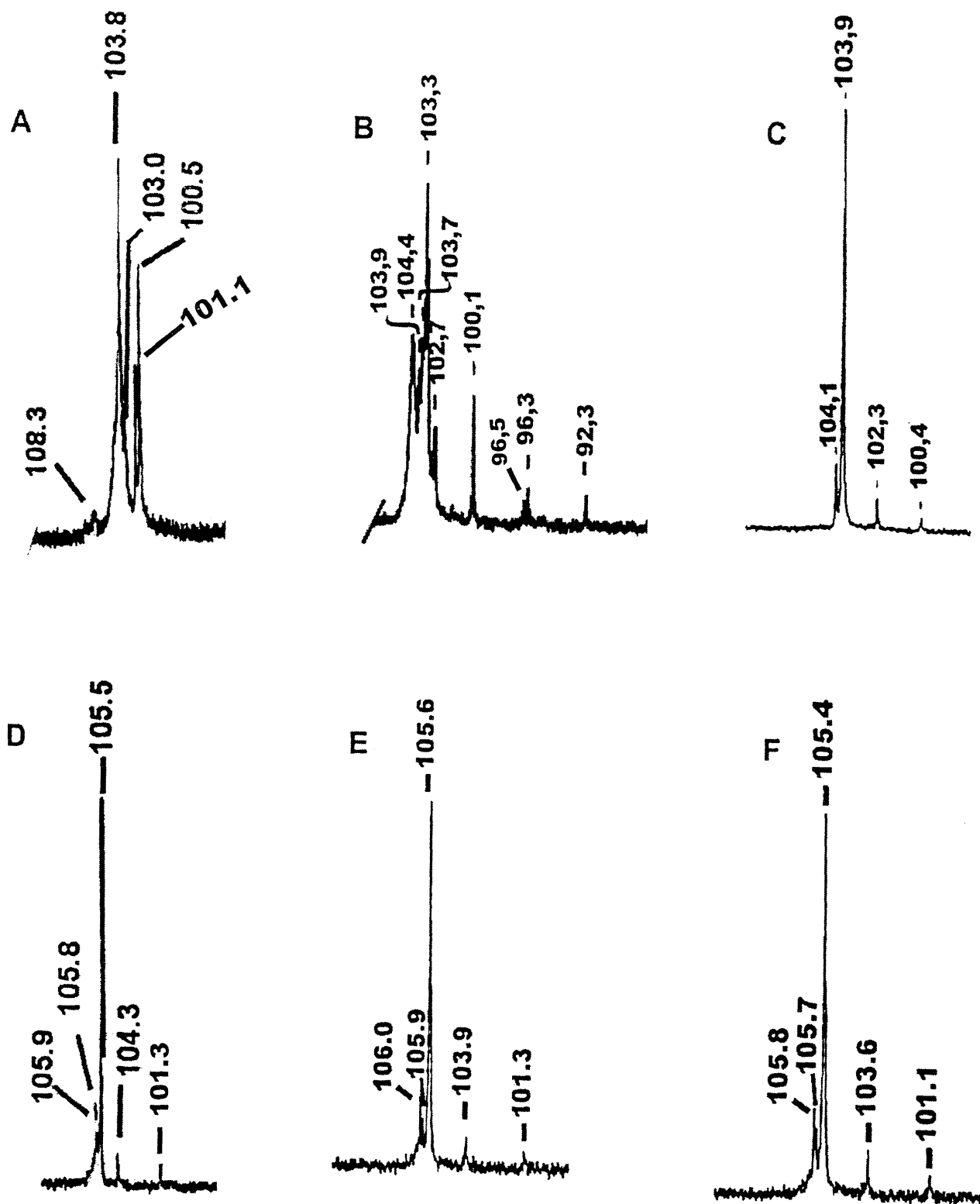


Figura 47: Região de C-1 dos espectros de RMN- ^{13}C dos polissacarídeos: PN (A), PPH (B), PPHDS1 (C), PDS1 (D), PDS2 (E) e PDS3 (F).

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. Abreviaturas: polissacarídeos, nativo (PN), parcialmente hidrolisado (PPH), parcialmente hidrolisado submetido à degradação controlada de Smith (PPHDS1), polissacarídeo da obtido da primeira degradação controlada de Smith (PDS1), polissacarídeo da obtido da segunda degradação controlada de Smith (PDS2), polissacarídeo da obtido da terceira degradação controlada de Smith (PDS3).

Tabela XIII: Sinais (em δ ppm) da região de C-1 dos espectros de RMN- ^{13}C dos polissacarídeos PN, PPH, PPHDS1, PDS1, PDS2 e PDS3 e os assinalamentos dos respectivos carbonos.

Sinais em δ (ppm) da região de C-1 dos espectros de RMN- ^{13}C dos polissacarídeos*:						
ESTRUTURAS	PN**	PPH	PPHDS1	PDS1	PDS2	PDS3
α -Araf-(1 \rightarrow DELGOBO <i>et al.</i> (1998)	108,3 (108,2)	-	-	-	-	-
\rightarrow 6)- β -Galp-(1 \rightarrow Fração F _{0,32} (já discutido) DELGOBO <i>et al.</i> (1998)	103,8 (103,6) (103,4)	103,7		sobrep. (105,3)	sobrep. (105,4)	sobrep. (105,3)
\rightarrow 3)- β -Galp-(1 \rightarrow 3) DEFAYE & WONG (1986)	sobrep. (104,5)	103,9	103,9	105,5	105,6	105,4
β -Galp-(1 \rightarrow DEFAYE & WONG (1986)	sobrep. (104,5)	sobrep. (104,4)	104,1			
\rightarrow 3)- β -Galp-(1 \rightarrow 3) 6 \downarrow	sobrep.	104,4		105,8 105,9	105,9 106,0	105,7 105,8
β -Glc pA-(1 \rightarrow Fração FH _{0,32} (discutido a seguir) GORIN & MAZUREK (1975) LÉON DE PINTO <i>et al.</i> (1995)	sobrep. (103,0) 103,0 (104,3) (104,3)	sobrep. (102,7)	-	-	-	-
\rightarrow 4)- β -Glc pA-(1 \rightarrow DELGOBO <i>et al.</i> (1998) DEFAYE & WONG (1986)	sobrep. (103,0) (102,9) (103,7)	sobrep.	-	-	-	-
α -Galp-(1 \rightarrow GORIN & MAZUREK (1975)	100,5 (100,5)	sobrep. (100,1)	sobrep. (100,4)			
α -Rhap DELGOBO <i>et al.</i> (1998) DEFAYE & WONG (1986)	101,1 (101,2) (101,6)	-	-	-	-	-
α -Galp-OH GORIN & MAZUREK (1975)	-	92,3 (92,8)	-			
β -Galp-OH GORIN & MAZUREK (1975)	-	96,5 96,3 (96,9)	-			
β -Arap (?) GORIN & MAZUREK (1975)	sobrep. (101,0)	sobrep. (102,7)	102,3	104,3	104,0	103,6
α -Glc p (?) GORIN & MAZUREK (1975) DE PAULA <i>et al.</i> (1998)	sobrep. (100,3) (101,1)	sobrep. (100,1)	sobrep. (100,4)	101,3	101,3	101,1

* polissacarídeos: nativo (PN), parcialmente hidrolisado (PPH), parcialmente hidrolisado submetido à degradação controlada de Smith (PPHPDS1), polissacarídeo da obtido da primeira degradação controlada de Smith do PN (PDS1), polissacarídeo da obtido da segunda degradação controlada de Smith (PDS2), polissacarídeo da obtido da terceira degradação controlada de Smith (PDS3). **Sobreposição de sinais em δ de 103,0 a 105,0.

4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO DO EXSUDATO VEGETAL DE *Anacardium occidentale*

4.6.1 Isolamento e composição monossacarídica dos oligossacarídeos obtidos a partir de hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo (PN)

Pelo procedimento de hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo, em TFA 1 M, 100°C, 1h, foram isolados oligossacarídeos. O produto desta hidrólise foi fracionado por cromatografia de adsorção em carvão ativo-terra de diatomácea (WHISTLER & BEMILLER, 1962a; LEMIEUX, 1962), obtendo-se um produto com rendimento de 12,8% (0,53 g), correspondendo a fração eluída em etanol aquoso 30%.

A análise qualitativa da fração etanol aquoso 30%, por cromatografia de partição em papel (solvente n° 2; *n*-butanol:piridina:H₂O, 1:1:1, v/v), apresentou componentes com diferentes R_{lact} . Os principais componentes foram os com R_{lact} de 0,32, 0,86 e 1,15, além de pequenas quantidades de componentes com R_{lact} de 0,14, 1,00, 1,30 e 1,44.

Afim de purificar os diferentes componentes presentes na fração eluída com etanol aquoso 30%, a mesma foi submetida a cromatografia de partição em papel preparativa (Whatman n°3, solvente n° 2).

Os oligossacarídeos purificados obtidos foram avaliados quanto sua composição monossacarídica por CP e por CG-EM. Nas frações que continham

ácido glucurônico, foi verificada a presença de traços de glucitol hexaacetato, marcados com $^2\text{H}_2$ no C-6.

Na Tabela XIV estão demonstrados os resultados, com relação, a composição monossacarídica por CG-EM e os rendimentos obtidos das frações purificadas por CP preparativa. As frações foram denominadas FH_{0,14}, FH_{0,32}, FH_{0,86}, FH_{1,00}, FH_{1,15}, FH_{1,30} e FH_{1,44}, de acordo com seus R_{lact} (calculados em CP, solvente n°2) e a sigla FH foi utilizada para distinguir das frações obtidas no sobrenadante etanólico, discutidas anteriormente.

Tabela XIV: Composição monossacarídica das frações purificadas obtidas pela hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de *A. occidentale*.

Composição monossacarídica (moles%)	FRAÇÕES OBTIDAS						
	FH _{0,14}	FH _{0,32}	FH _{0,86}	FH _{1,00}	FH _{1,15}	FH _{1,30}	FH _{1,44}
Arabinose	2	-	-	7	4	46	14
Galactose	95	79	100	82	96	54	70
Glucose*	3	21	-	6	-	-	-
Manose	-	-	-	5	-	-	16
Rendimento	5,5	26,0	9,0	1,3	4,0	3,2	1,5
(%)**	(29)	(139)	(47)	(7)	(20)	(17)	(8)

* Identificada na forma de glucose hexaacetato, indicando a presença de glucuronolactona. ** Os rendimentos das frações purificadas foram calculados em relação a fração obtida da cromatografia de adsorção em carvão-terra de infusórios, eluída em etanol aquoso 30%. Entre parênteses estão as quantidades obtidas em mg.

A caracterização estrutural destes oligossacarídeos foi realizada por espectroscopia de RMN de próton e carbono treze, incluindo ^{13}C -DEPT135, o qual serve para identificação dos sinais de unidades de galactose O-6 substituídas (sinais invertidos na região δ 67-70). Pelos espectros monodimensionais de ^1H e ^{13}C , foram atribuídos os principais sinais dos respectivos carbonos (de acordo com literatura específica) e obtidas informações em relação a pureza, o número de unidades sacarídicas, a configuração anômérica das unidades constituintes, bem como a presença de substituintes não glicídicos. Para a fração $\text{FH}_{1,30}$, foram também utilizadas as técnicas bidimensionais de RMN como, COSY, TOCSY, ROESY e HMQC. As técnicas de ROESY e HMQC foram necessárias para obter as informações sobre o tipo de ligação e a sequência das unidades sacarídicas.

4.6.2 Caracterização estrutural da Fração $\text{FH}_{0,14}$

O espectro de RMN- ^{13}C (Figura 48) mostrou, na região de C-1, 5 sinais em δ 103,1, 103,7, 103,6, 96,9 e 92,8. Esses sinais foram similares ao encontrado por DELGOBO *et al.* (1998) para o trissacarídeo $\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$, isolado a partir da hidrólise parcial do polissacarídeo do exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina*.

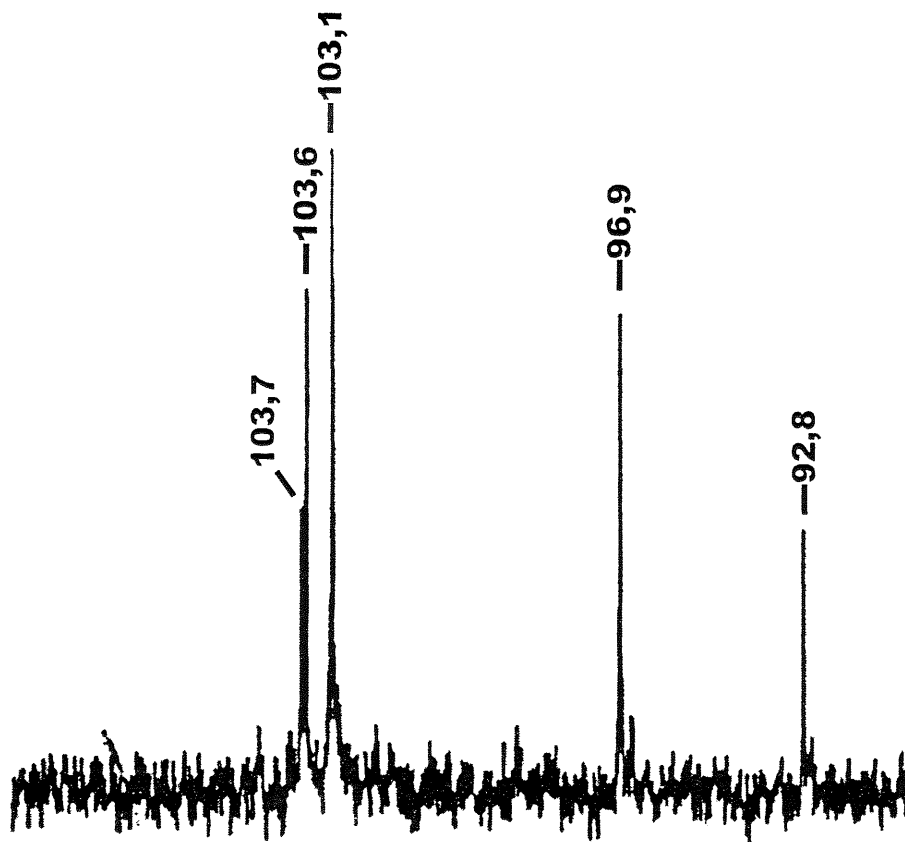


Figura 48: Região de C-1 do espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração $\text{FH}_{0,14}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Para unidade de $\beta\text{-D-GlcpA}$ foram atribuídos os sinais em δ 103,1, correspondente ao C-1 desta unidade e em δ 176,2 para o C-6 (não mostrado no espectro).

Para unidade de galactose não redutora (β') [$\rightarrow 6$]- $\beta\text{-Galp}$ -(1 \rightarrow) foram atribuídos para o C-1, os sinais em δ 103,7 (β' α) e em 103,6 (β' β). A presença desses dois sinais é em virtude da influência da unidades redutoras de $\alpha\beta$ -galactose. Pelo espectro de RMN de ^{13}C -DEPT135 (Figura 49), foi atribuído o sinal em δ 70,0 para o C-6 substituído desta unidade. Não foi verificado no espectro de espectro de RMN- ^{13}C , nenhum sinal de carbonos 2-O-, 3-O-, 4-O-substituídos.

Para unidade de galactose redutora foram atribuídos os sinais em 96,9 e 92,8, para os anômeros β e α , respectivamente. Pelo espectro de ^{13}C -DEPT135 (Figura 49), foram feitos os assinalamentos para os carbonos 6 *O*-substituídos, sendo assinalados em δ 69,6 para anômero β e δ 69,8 para o α .

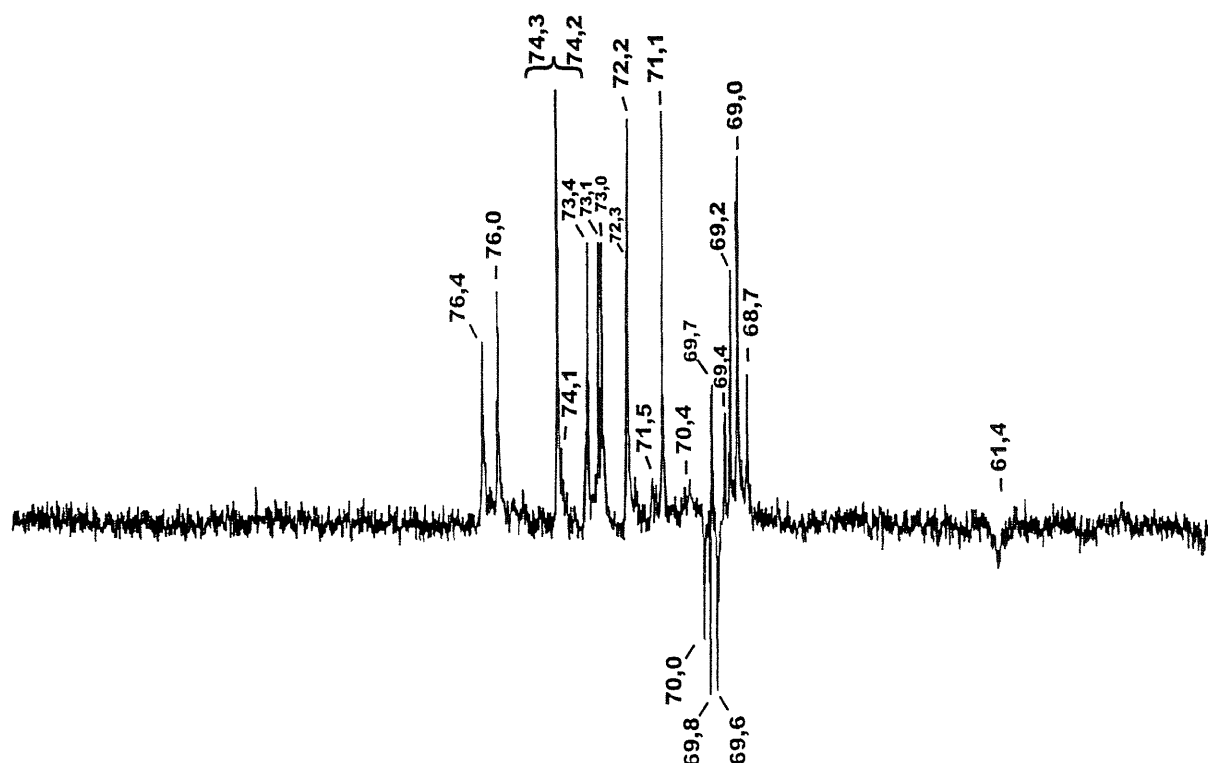


Figura 49: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 da fração $\text{FH}_{0,14}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

No espectro de RMN- ^1H (Figura 50) foram assinalados, na região de H-1, o sinal para unidade de ácido glucurônico terminal, em δ 4,50 (J 7,7 Hz), indicando a configuração β pelo valor da constante de acoplamento. Os sinais, para unidade de galactose não redutora, em δ 4,43 (β' α) (J 7,9 Hz) e em 4,44 (β' β) (J 7,9 Hz) e

para unidade de galactose redutora os sinais em δ 4,58 (J 7,8 Hz), para anômero β e em δ 5,25 (J 3,7 Hz), para anômero α .

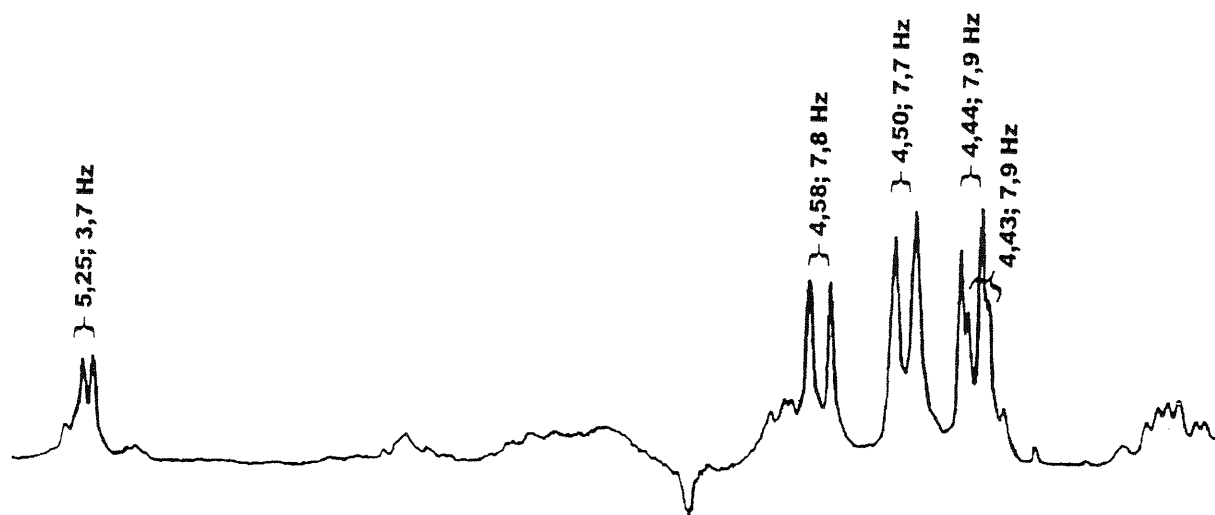
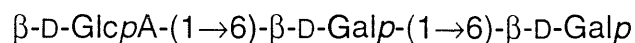


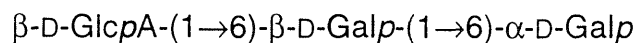
Figura 50: Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (400,13 MHz) da fração $\text{FH}_{0,14}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

A fração $\text{FH}_{0,14}$, obtida a partir da hidrólise ácida parcial do PN do exsudato vegetal de *A. occidentale*, corresponde ao trissacarídeo $\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$, apresentando os principais assinalamentos (em δ ppm) obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H :



4,50 (H-1)	4,44 (H-1)	4,58 (H-1)
103,1 (C-1)	103,6 (C-1)	96,9 (C-1)
176,2 (C-6)	70,0 (C-6)	69,6 (C-6)



4,50 (H-1)	4,43 (H-1)	5,25 (H-1)
103,1 (C-1)	103,7 (C-1)	92,8 (C-1)
176,2 (C-6)	70,0 (C-6)	69,8 (C-6)

4.6.3 Caracterização estrutural da Fração FH_{0,32}

O espectro de RMN-¹³C (Figura 51) mostrou, na região de C-1, 4 sinais em δ 102,86 (maior), 102,82 (menor), 96,8 (maior) e 92,8 (menor) e na região de campo alto, o sinal de δ 175,6, mostrando a presença de ácido urônico. Esses sinais sugerem a presença de um dissacarídeo similar ao encontrado por DELGOBO (1993) isolado a partir da hidrólise parcial do polissacarídeo do exsudato vegetal de *Anadenanthera colubrina*. Pelos dados de composição monossacarídica e pelos sinais de C-1, tem-se o ácido aldobiourônico $\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$.

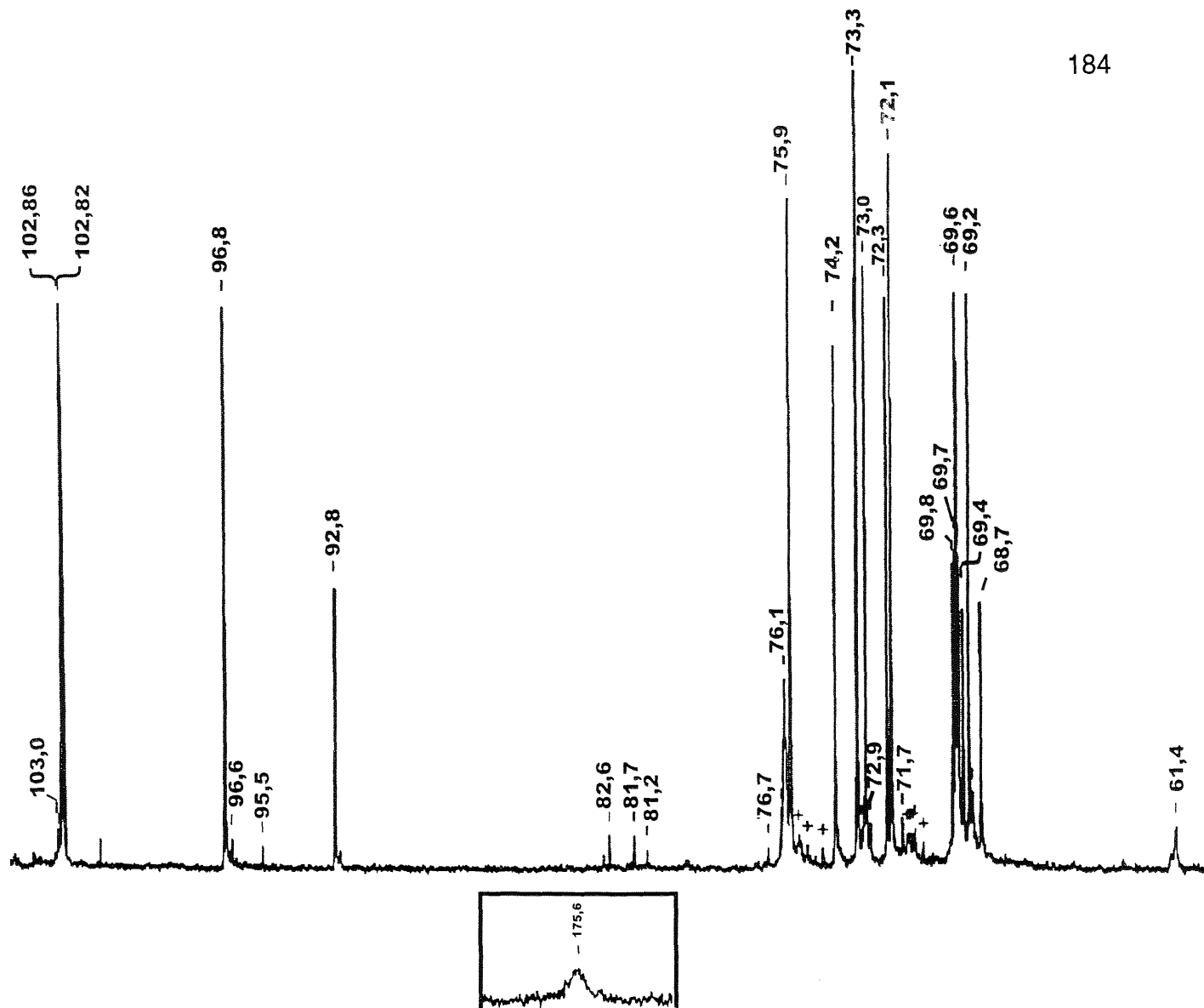


Figura 51: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração $\text{FH}_{0,32}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Para unidade de β -D-GlcpA foram atribuídos os sinais em δ 102,86 (β' β) e 102,82 (β' α) correspondente ao C-1 desta unidade e em δ 175,6 para o C-6. Para unidade de galactose redutora foram atribuídos os sinais em δ 96,9 e 92,8, para os anômeros β e α , respectivamente. Os sinais de C-6 *O*-substituído, foram assinalados em δ 69,6 para anômero β e 69,8 para o α . Os assinalamentos para os carbonos 6 foram confirmados pelo espectro de ^{13}C -DEPT135 (Figura 52).

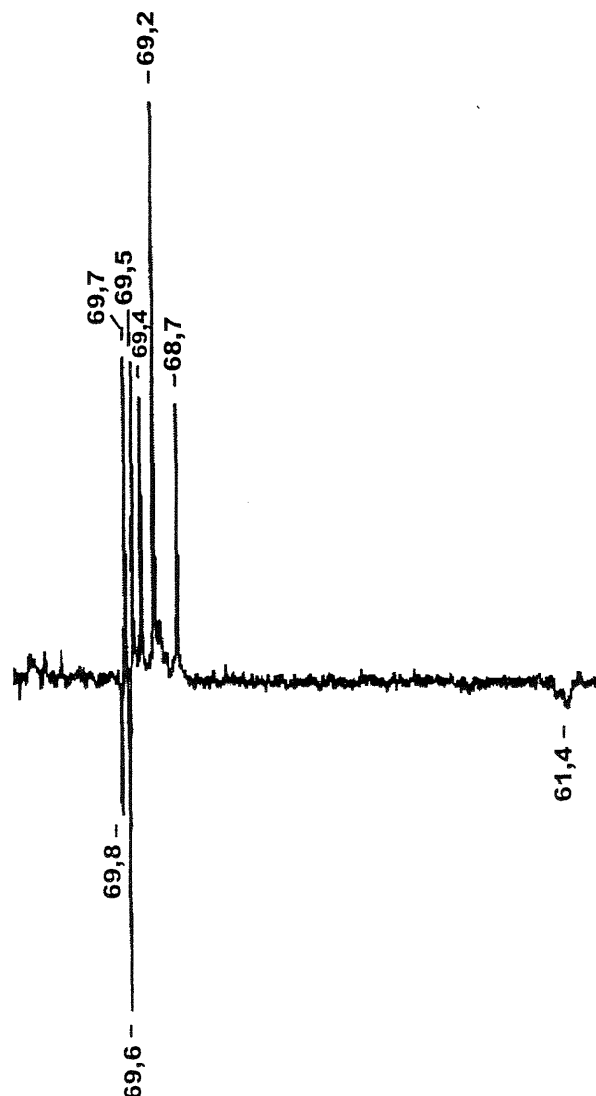


Figura 52: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 da fração $\text{FH}_{0,32}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

No espectro de RMN- ^1H (Figura 53), foram assinalados, na região de H-1, os sinais para unidade de ácido glucurônico terminal, em δ 4,48 (β' α) (J 7,9 Hz) e em δ 4,49 (β' β) (J 8,1 Hz), os dois sinais encontrados mostram a influência da unidade redutora de galactose, além, da confirmação pelo valor da constante de acoplamento da configuração β . Os sinais em δ 4,55 (J 7,0 Hz) e em δ 5,23 (J 3,7 Hz) foram atribuídos para os anômeros β e α , respectivamente, da unidade de galactose redutora.

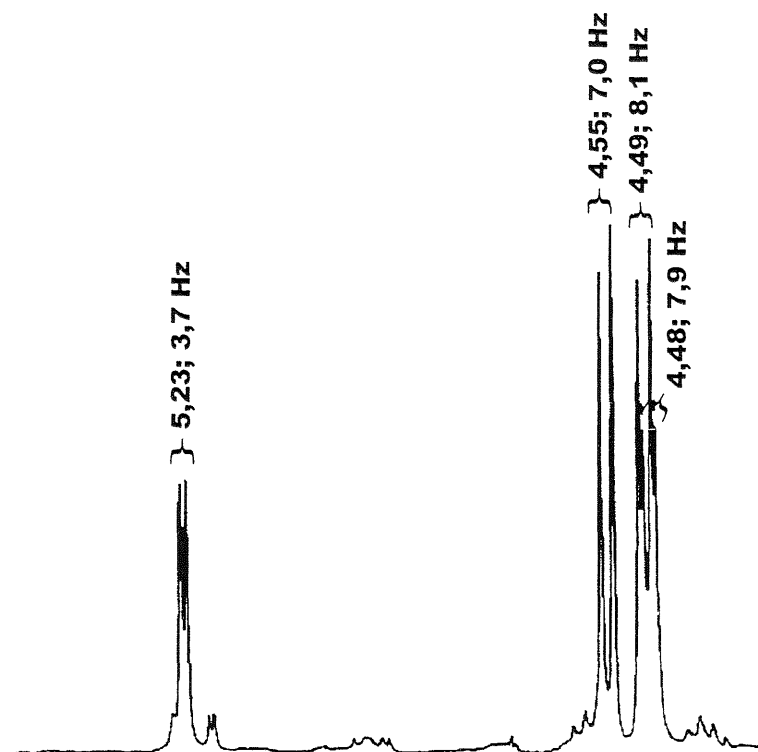


Figura 53: Região de H-1, do espectro de RMN- ^1H (400,13 MHz) da fração $\text{FH}_{0,32}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

A fração $\text{FH}_{0,32}$ obtida a partir da hidrólise ácida parcial do PN do exsudato vegetal de *A. occidentale*, corresponde ao dissacarídeo $\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$, apresentando os principais assinalamentos (em δ ppm) obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H :

$$\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Galp}$$

4,49 (H-1)	4,55 (H-1)
102,86 (C-1)	96,8 (C-1)
175,6 (C-6)	69,6 (C-6)

$$\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}$$

4,48 (H-1)	5,23 (H-1)
102,82 (C-1)	92,8 (C-1)
175,6 (C-6)	69,8 (C-6)

A caracterização estrutural das frações FH_{0,14} e FH_{0,32}, mostram que no polissacarídeo nativo, o ácido glucurônico está unido às unidades de galactose pelo carbono 6. Esses resultados são concordantes com o aldobiurônico isolado por ANDERSON & BELL (1975), por hidrólise ácida parcial do polissacarídeo do cajueiro (Índia). Esses autores verificaram a presença do ácido aldobiurônico $\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$. Porém, para a goma de cajueiro, de origem indiana, foi verificada também a presença, em pequenas quantidades, de uma fração que apresentou o mesmo R_f em cromatografia de partição em papel de um ácido aldobiurônico 4-O-Me- $\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$.

O ácido aldobiurônico $\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$, representa o mais comum oligossacarídeo ácido obtido a partir de hidrólise ácida parcial de polissacarídeos de exsudatos vegetais (WHISTLER & ROWELL, 1966).

4.6.4 Caracterização estrutural da Fração FH_{0,86}

O espectro de RMN-¹³C (Figura 54) mostrou, na região de C-1, os sinais em δ 103,6 (maior), 103,7, 99,0, 96,92, 96,88 (maior), 92,82 e 92,80 (maior). Não foi detectado nenhum sinal em campo baixo, referente a COOH, como esperado, uma vez que na composição monossacarídica desta fração foi verificada apenas galactose.

O espectro de ¹³C-DEPT135 (Figura 55) apresentou sinais invertidos em δ 61,4 (maior) e 61,6, ambos para CH₂OH (C-6 livre) e em δ 67,1 (maior), 67,3 e 69,5, correspondendo aos carbonos 6-O-substituídos.

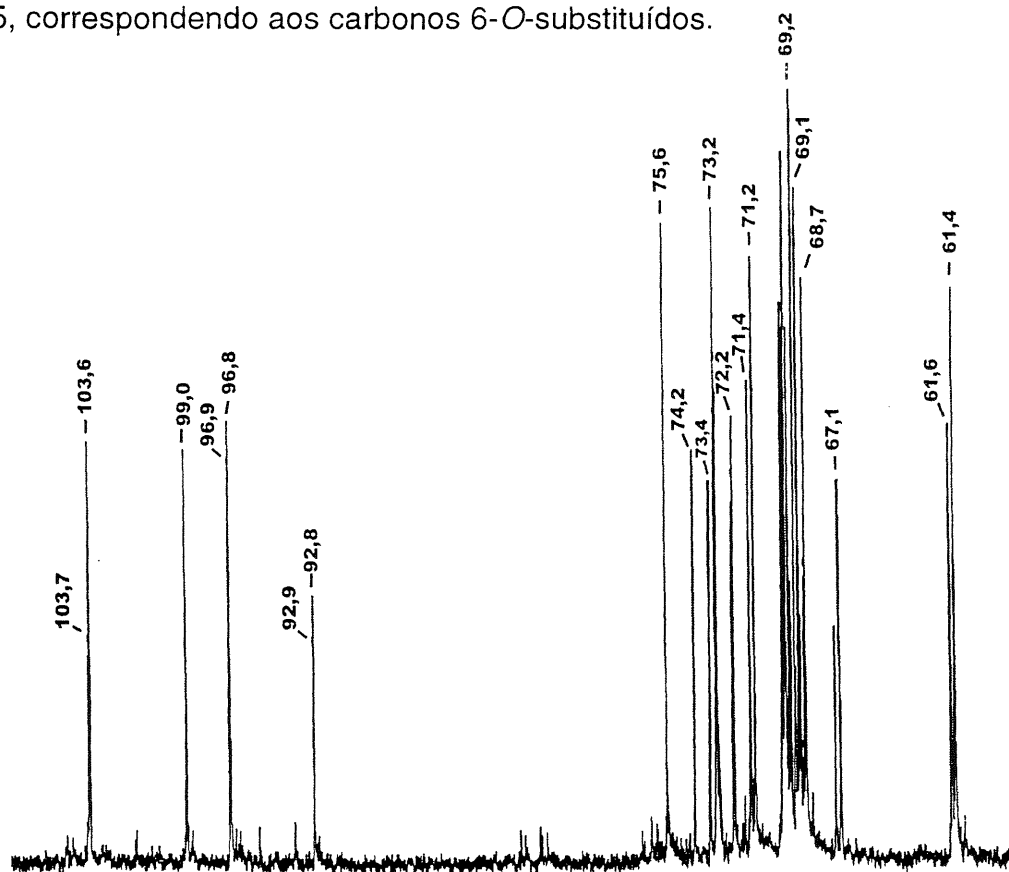


Figura 54: Espectro de RMN-¹³C (100,61 MHz) da fração FH_{0,86}, em D₂O, a 30°C.

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

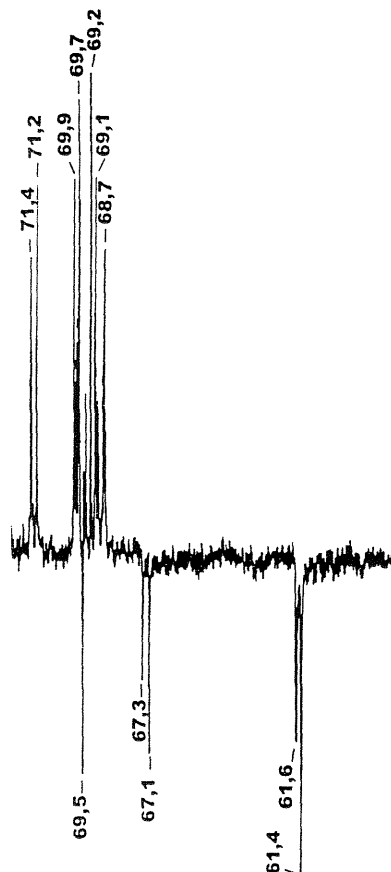


Figura 55: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 da fração $\text{FH}_{0,86}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Pelos espectros obtidos, e também pelos dados de composição monossacarídica e pelo R_{lact} , sugere-se que esta fração é uma mistura de um dissacarídeo de galactose: $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ e $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$.

Pelo espectro de RMN- ^1H (Figura 56), a presença desta mistura é confirmada, apresentando os sinais, na região de H-1, em δ 4,43 (J 7,7 Hz), 4,44 (J 8,1 Hz), 4,58 (J 8,0 Hz) e em 5,24 (J 4,0 Hz) correspondendo ao dissacarídeo $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$. Além dos sinais em δ 4,96 (J 3,5 Hz), 4,57 (J 7,9 Hz) e em 5,25 (J 4,0 Hz), correspondendo ao dissacarídeo $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$. Os assinalamentos para os prótons do anômero α podem ser invertidos.

Os assinalamentos obtidos para o dissacarídeo β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp foram similares aos obtidos para a fração $F_{0,83}$, isolada a partir do sobrenadante etanólico do exsudato vegetal do cajueiro descrita, anteriormente.

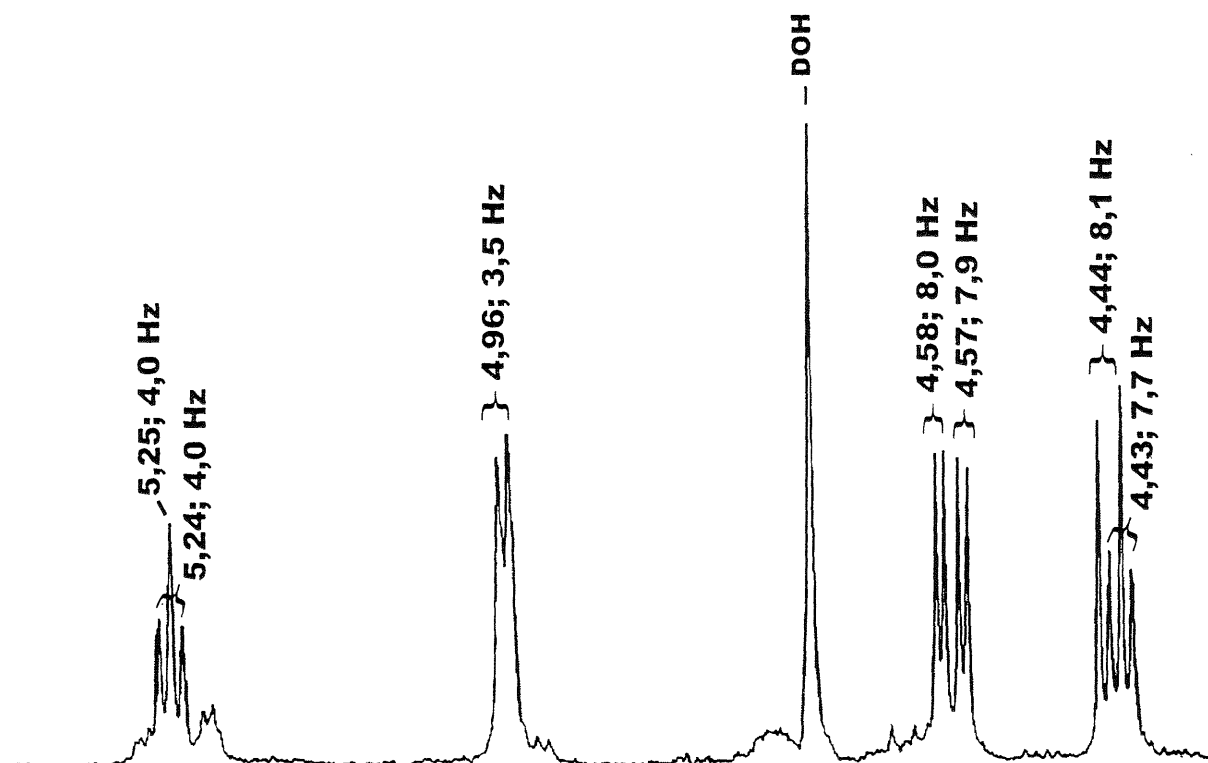


Figura 56: Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (400,13 MHz) da fração $FH_{0,86}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

A fração $FH_{0,86}$ obtida a partir da hidrólise ácida parcial do PN do exsudato vegetal de *A. occidentale*, corresponde a mistura dos dissacarídeos β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp e α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp, apresentando os principais assinalamentos (em δ ppm) obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H :

β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp

4,44 (H-1)	4,58 (H-1)
103,6 (C-1)	96,9 (C-1)
61,4 (C-6)	69,5 (C-6)

 β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Galp

4,43 (H-1)	5,24 (H-1)
103,7 (C-1)	92,8 (C-1)
61,6 (C-6)	

 α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp

4,44 (H-1)	4,57 (H-1)
103,6 (C-1)	96,88 (C-1)

 α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Galp

4,96 (H-1)	5,25 (H-1)
96,88 (C-1)	92,8 (C-1)

4.6.5 Caracterização estrutural da Fração FH_{1,15}

O espectro de RMN-¹³C (Figura 57) mostrou, na região de C-1, os sinais em δ em 104,81, 104,76 (maior), 96,6 (maior) e 92,6. Observa-se 2 sinais na região de C-3 O-substituídos, em δ 82,9 e 79,8. Para unidade terminal de galactose foram atribuídos os sinais de C-1 em δ 104,76 (β' β) e 104,81 (β' α) e os sinais de C-6 livre em δ 61,4 (β' β) (maior) e 61,6 (β' α) (menor). Para unidade de galactose redutora, o anômero α apresentou os sinais de C-1 em δ 92,6 e para C-3 em δ 79,8. E para o anômero β , foi atribuído o sinal em δ 96,6 (C-1) e o em δ

82,9, para C-3 *O*-substituído.

O espectro de ^{13}C -DEPT135 (Figura 58) apresentou sinais invertidos em δ 61,4 (maior) e 61,6 (menor), ambos para C-6 livre (CH_2OH).

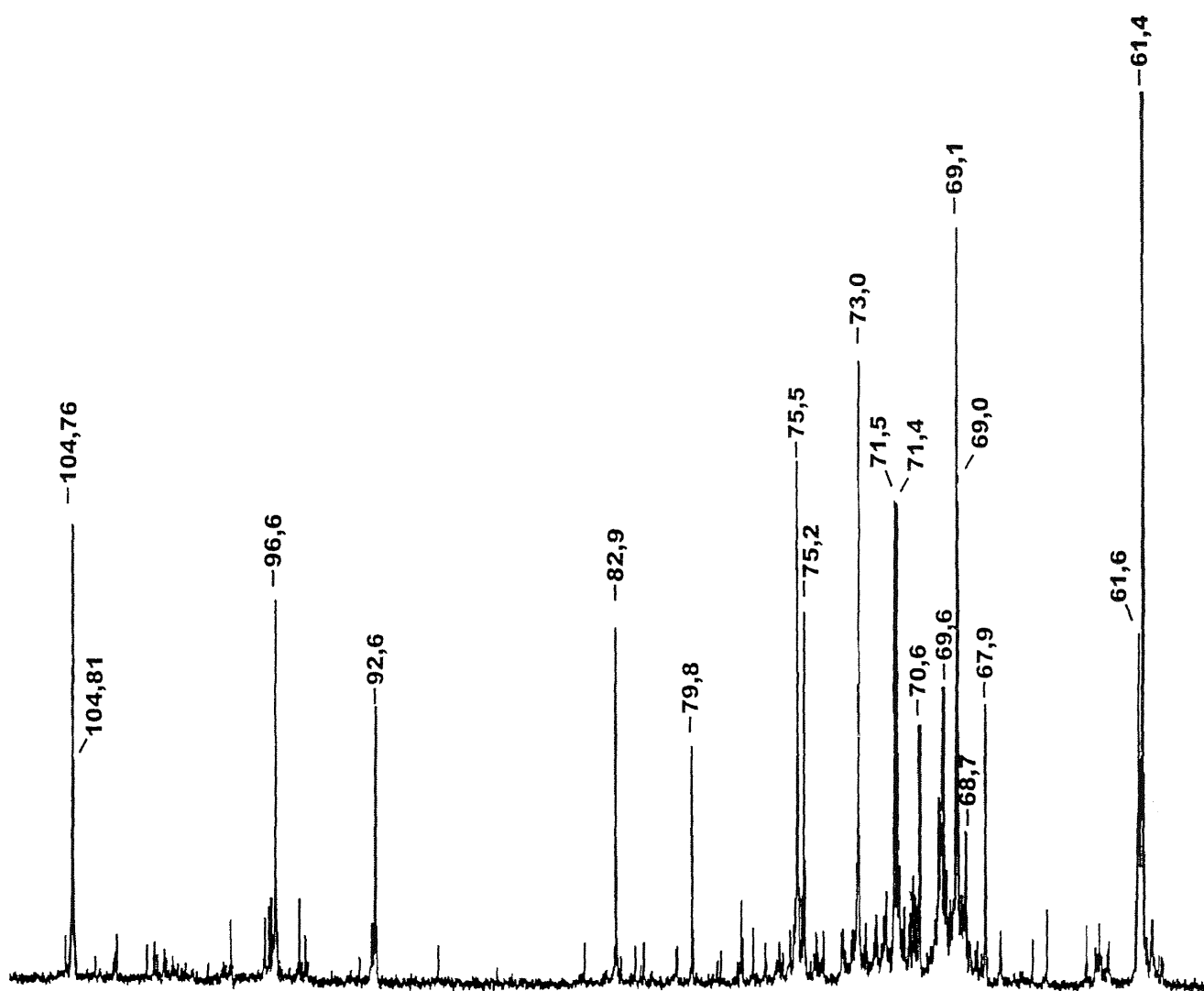


Figura 57: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração $\text{FH}_{1,15}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

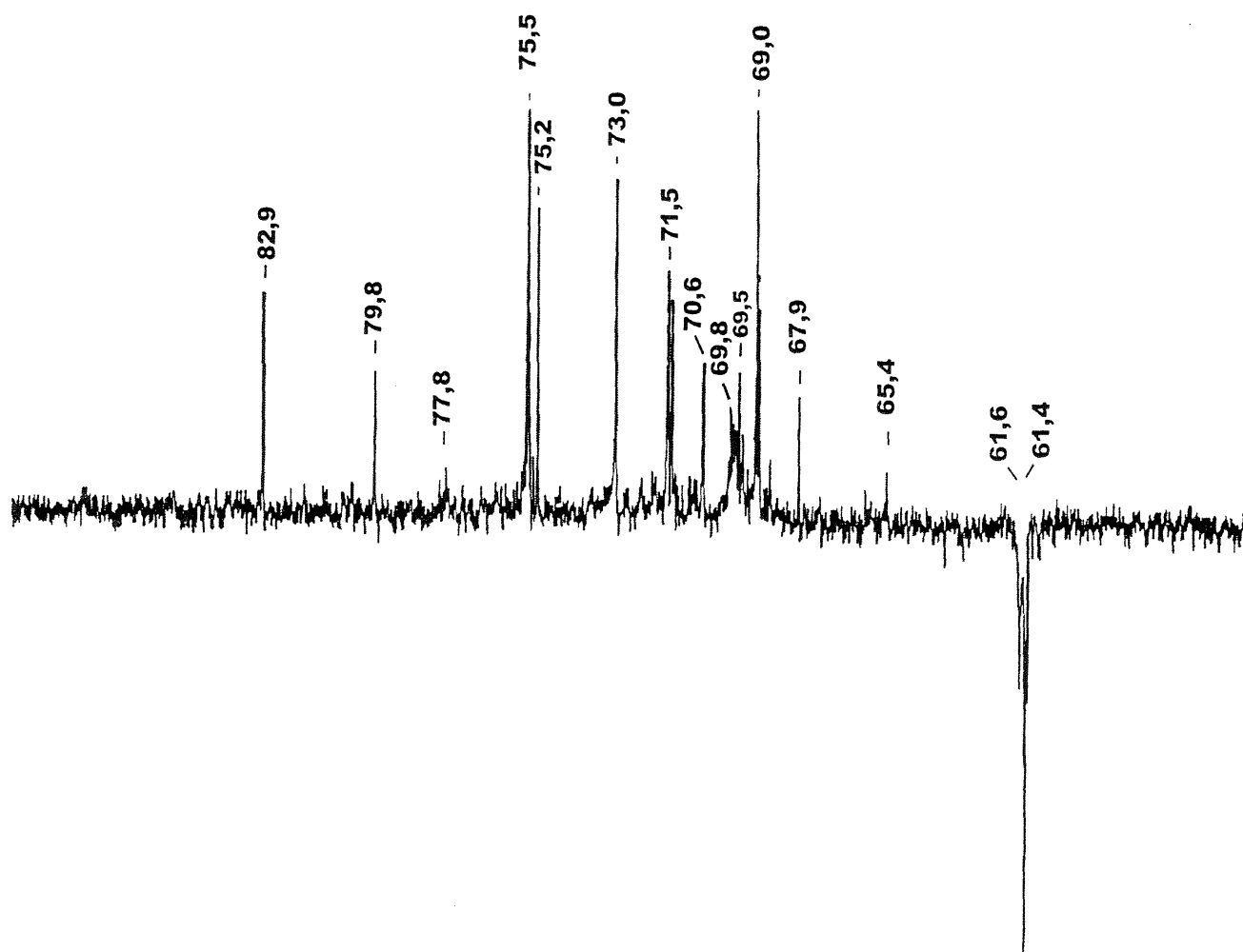


Figura 58: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 da fração $\text{FH}_{1,15}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Pelo espectro de RMN- ^1H (Figura 59), atribuiu-se na região de H-1, para unidade terminal de galactose, os sinais em δ 4,59 (J 7,5 Hz) (β' α) e em δ 4,60 (J 7,5 Hz) (β' β). Para unidade redutora de α -galactose foi atribuído o sinal em δ 5,25 (J 2,7 Hz) e para anômero β em δ 4,62 (J 7,1 Hz).

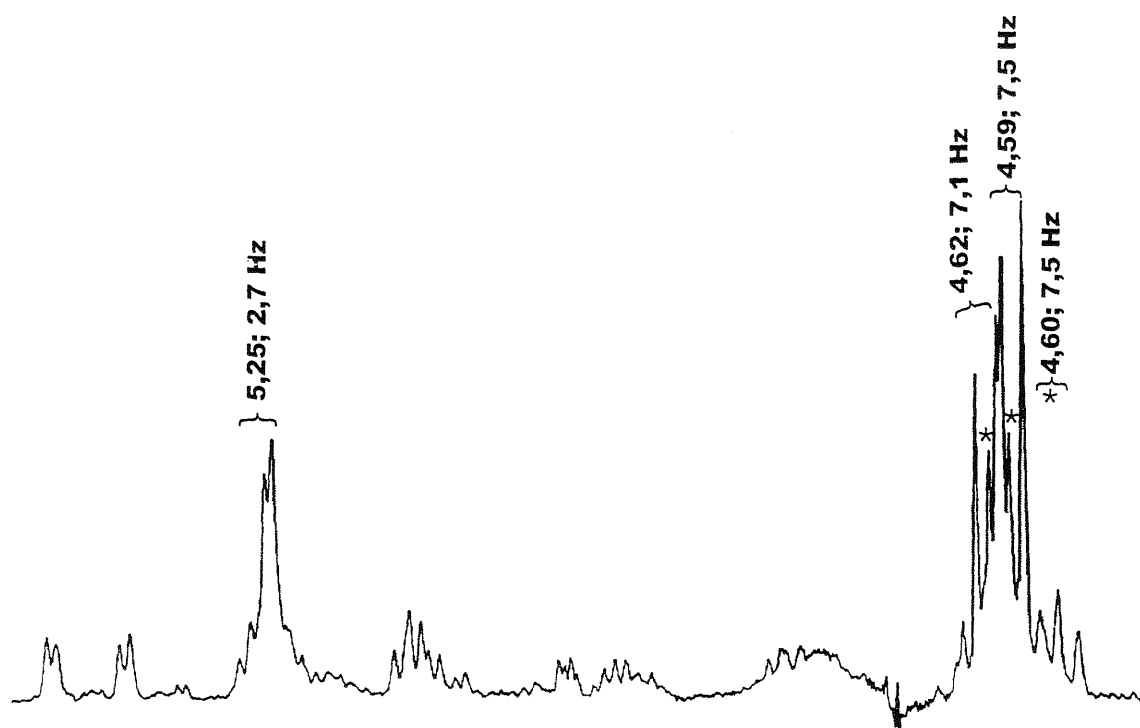


Figura 59: Região de H-1 do espectro de RMN- ^1H (400,13 MHz) da fração $\text{FH}_{1,15}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Pelos dados de composição monossacarídica e pelos assinalamentos dos espectros verifica-se nesta fração o dissacarídeo de galactose: $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$.

A caracterização estrutural das frações $\text{FH}_{0,86}$ e $\text{FH}_{1,15}$, confirmam a presença de unidades de galactose participando de ligações do tipo $(1\rightarrow6)$ e $(1\rightarrow3)$ no polissacarídeo nativo, o que tinha-se verificado pelos dados de metilação e pelos espectros de RMN. Além disso, ANDERSON & BELL (1975), por hidrólise ácida parcial do polissacarídeo do cajueiro (Índia), isolaram duas galactobioses, caracterizadas como $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ (maior componente) e $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ (menor componente).

Pode-se salientar, que o dissacarídeo β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp, também foi encontrado como principal componente de baixa massa molecular presente na goma do cajueiro, objeto de estudo desta tese.

A fração FH_{1,15} obtida a partir da hidrólise ácida parcial do PN do exsudato vegetal do *A. occidentale*, corresponde ao dissacarídeo β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α β -D-Galp, apresentando os principais assinalamentos (em δ ppm) atribuídos pelso espectros de RMN de ^{13}C e ^1H :

β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp

4,60 (H-1)	4,62 (H-1)
104,76 (C-1)	96,6 (C-1)
61,4 (C-6)	82,9 (C-3)

β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp

4,59 (H-1)	5,27 (H-1)
104,81 (C-1)	92,6 (C-1)
61,6 (C-6)	79,8 (C-3)

4.6.6 Caracterização estrutural da Fração FH_{1,30}

Esta fração apresentou-se pura em análise qualitativa por cromatografia de partição em papel (CP), sendo constituída de arabinose e galactose, na mesma proporção.

O espectro de RMN- ^{13}C (Figura 60) apresentou 3 sinais principais, na região de C-1, em δ 108,2, 96,9 e 92,8, indicando a presença de dissacarídeo

formado por arabinofuranose (pelo sinal característico em δ 108,2) e galactopirranose redutora (sinais característicos em δ 96,9 e 92,8). Os assinalamentos dos carbonos foram feitos de acordo os dados de literatura (GORIN & MAZUREK, 1975; DELGOBO *et al.*, 1998) e dos obtidos para a fração F_{0,83}, correspondente ao dissacarídeo β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D- α β -Galp, discutida anteriormente.

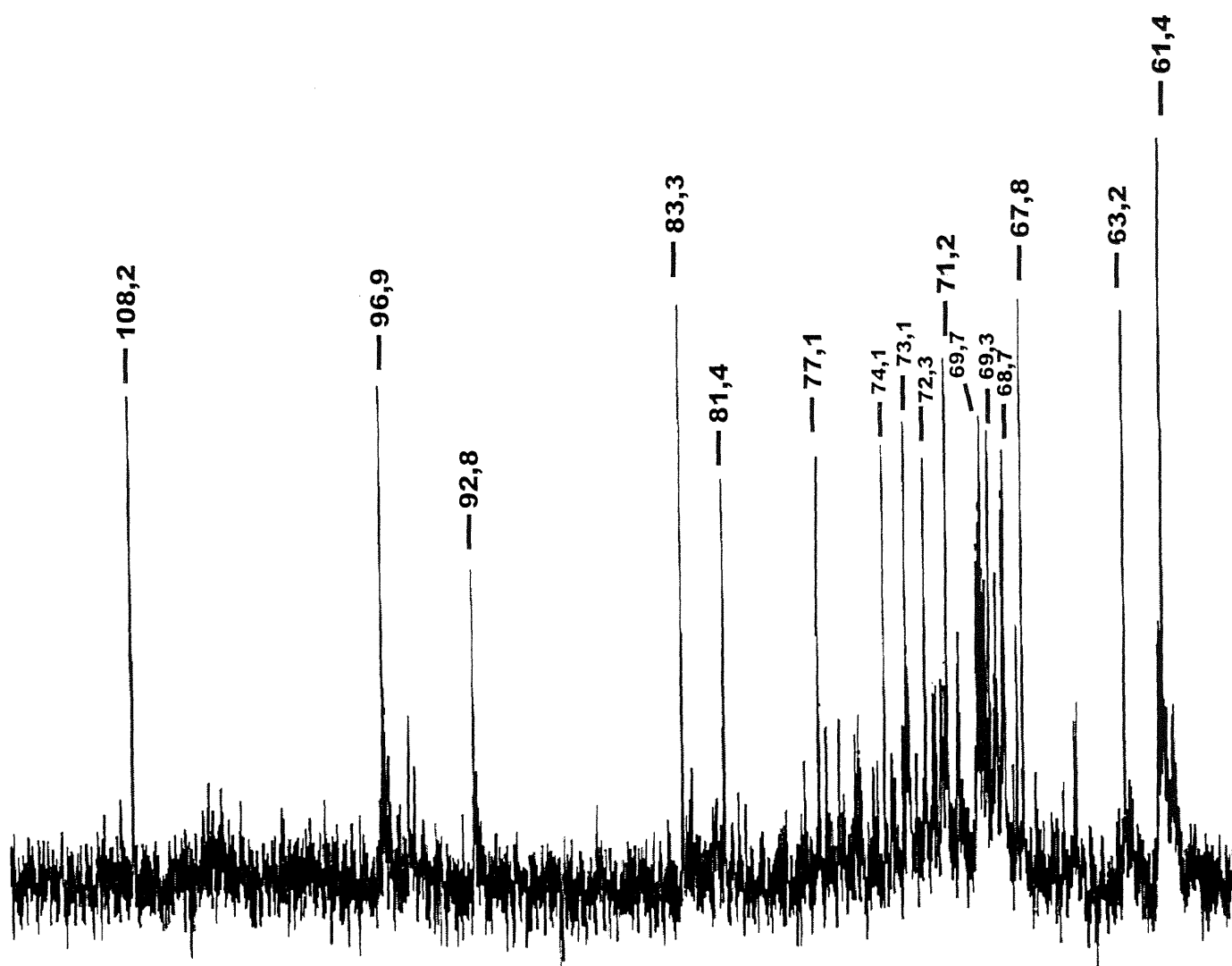


Figura 60: Espectro de RMN-¹³C (100,61 MHz) da fração FH_{1,30}, em D₂O, a 30°C.

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Foram atribuídos os sinais dos respectivos carbonos para unidade de α -Araf em δ 108,2 (C-1), 81,4 (C-2), 77,1 (C-3), 83,3 (C-4) e para C-5 em δ 63,1 (β) (maior) e δ 63,2 (α), sendo que os sinais de C-5 foram confirmados pelo espectro de ^{13}C -DEPT135.

Para a unidade redutora, foram assinalados para β -Galp, os sinais em δ 96,9 (maior) (C-1), 72,3 (C-2), 73,1 (C-3) e 74,1 (C-5) e para α -Galp, os sinais em δ 92,8 (menor) (C-1) e 68,8 (C-2). Os sinais de C-4 da unidade de β -Galp e de C-3 e C-4 de α -Galp não foram assinalados pelo espectro de RMN- ^{13}C . Pelo espectro de ^{13}C -DEPT135 (Figura 61), pode-se atribuir os sinais de C-6 que mostram-se invertidos em δ 67,8 (maior) (β) e em δ 68,1 (α), ocorre um deslocamento para campo mais baixo do C-6 da galactose, mostrando a presença de ligação do tipo (1 \rightarrow 6) (ADINOLFI *et al.*, 1991).

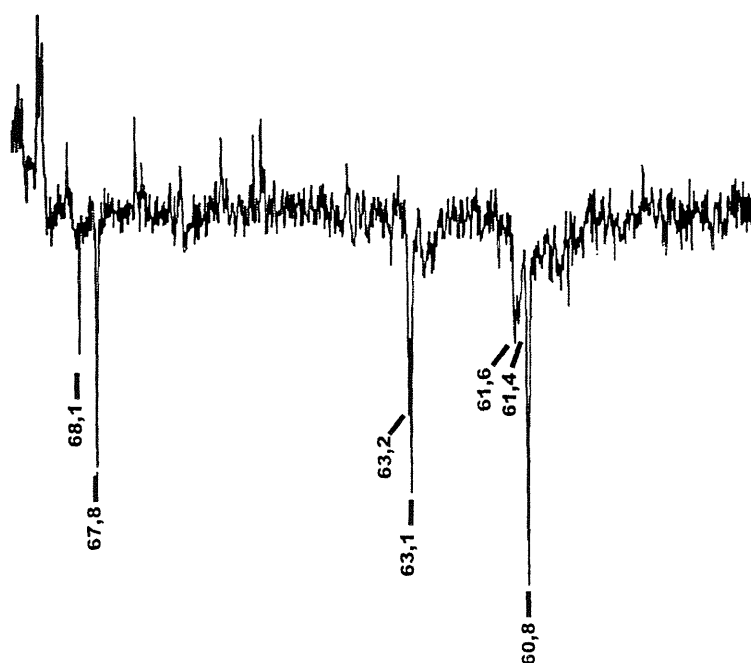


Figura 61: Espectro parcial de RMN de ^{13}C -DEPT135 da fração $\text{FH}_{1,30}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm.

Pelo espectro de RMN- ^1H (não mostrado), atribuiu-se na região de H-1, o sinal em δ 5,02 (J 2,0 Hz) para unidade de α -L-Araf e os sinais para α e β -D-galactose em δ 5,24 (J 2,8 Hz) e em δ 4,56 (J 8,0 Hz), respectivamente.

Pelo espectro de RMN de correlação DQFCOSY [^1H - ^1H] (Figura 62), obteve-se os assinalamentos para os H-2. Para unidade de α -arabinofuranose tem-se a correlação entre o sinal de H-1 em δ 5,02 com o sinal de H-2 em δ 4,10. Para as unidades redutoras de α -D-Galp, partindo-se de H-1 em δ 5,24 (na diagonal central) tem-se o assinalamento em δ 3,81 para H-2, do mesmo modo que para a unidade de β -D-Galp, onde a partir de δ 4,56 obtêm-se o deslocamento para H-2 em δ 3,49. Estas correlações estão mostrados no espectro. Os sinais para H-3, H-4, H-5 e H-6 não foram assinalados por este espectro devido a sobreposições.

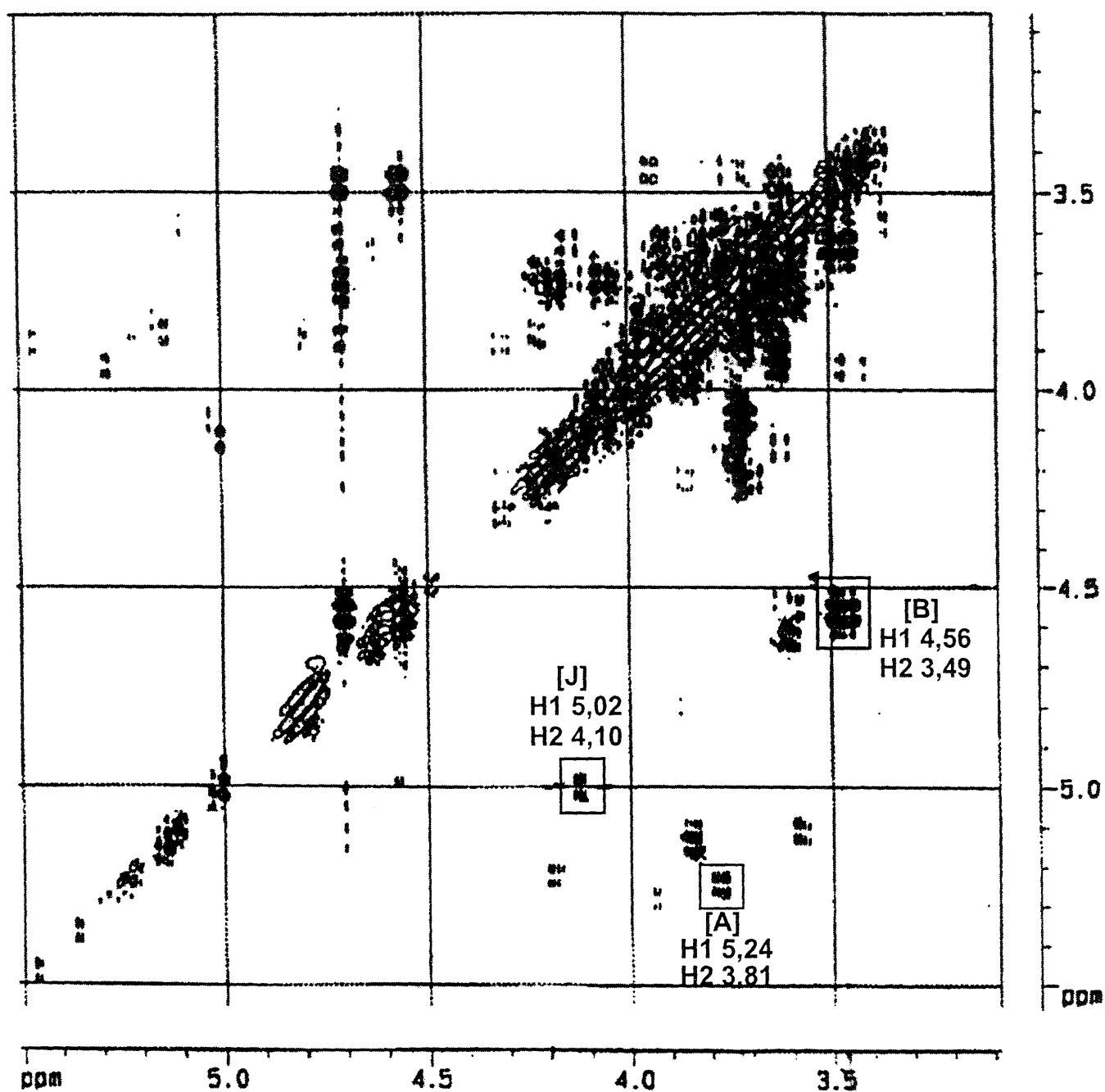


Figura 62: Espectro de RMN de correlação DQFCOSY [^1H - ^1H] da fração $\text{FH}_{1,30}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. A: α -D-Galp; B: β -D-Galp; J: α -L-Araf-(1 \rightarrow).

Pelo espectro de RMN de correlação TOCSY [^1H - ^1H] (Figura 63), obteve-se para unidade α -Araf a correlação entre o sinal de H-1 (em δ 5,02) com o sinal em δ 4,08. Para a unidade redutora de α -galactose tem-se as correlações do sinal de H-1 (em δ 5,24) com os sinais em δ 3,96, 3,82 e 3,78. Para a unidade de β -galactose verifica-se as correlações entre o sinal de H-1 (em δ 4,56) com os sinais em δ 3,90, 3,62 e 3,46. Estas correlações estão mostrados no espectro. Porém, pelo espectro de TOCSY não foi possível identificar os assinalamentos dos respectivos prótons, assim, os sinais de prótons foram confirmados e assinalados, a partir dos valores já conhecidos das ressonâncias de ^{13}C , por outro experimento de RMN de correlação HMQC.

Pelo espectro de RMN de correlação HMQC (inverso) (Figura 64), na região de C-1, obteve-se as correlações dos sinais de C-1 com H-1, para unidade de α -Araf em δ 108,2 com 5,02, para unidade de α -Galp em δ 92,8 com 5,24 e para β -Galp em δ 96,9 com 4,56. Em outra região ampliada do espectro tem-se para unidade de α -Araf as correlações entre os sinais em δ 81,4 (C-2) e 4,10 (H-2); em δ 77,1 (C-3) e 4,04 (H-3); em δ 83,3 (C-4) e 3,95; e em δ 63,1 (e 63,2) (C-5, sinal invertido) e 3,66 (H-5).

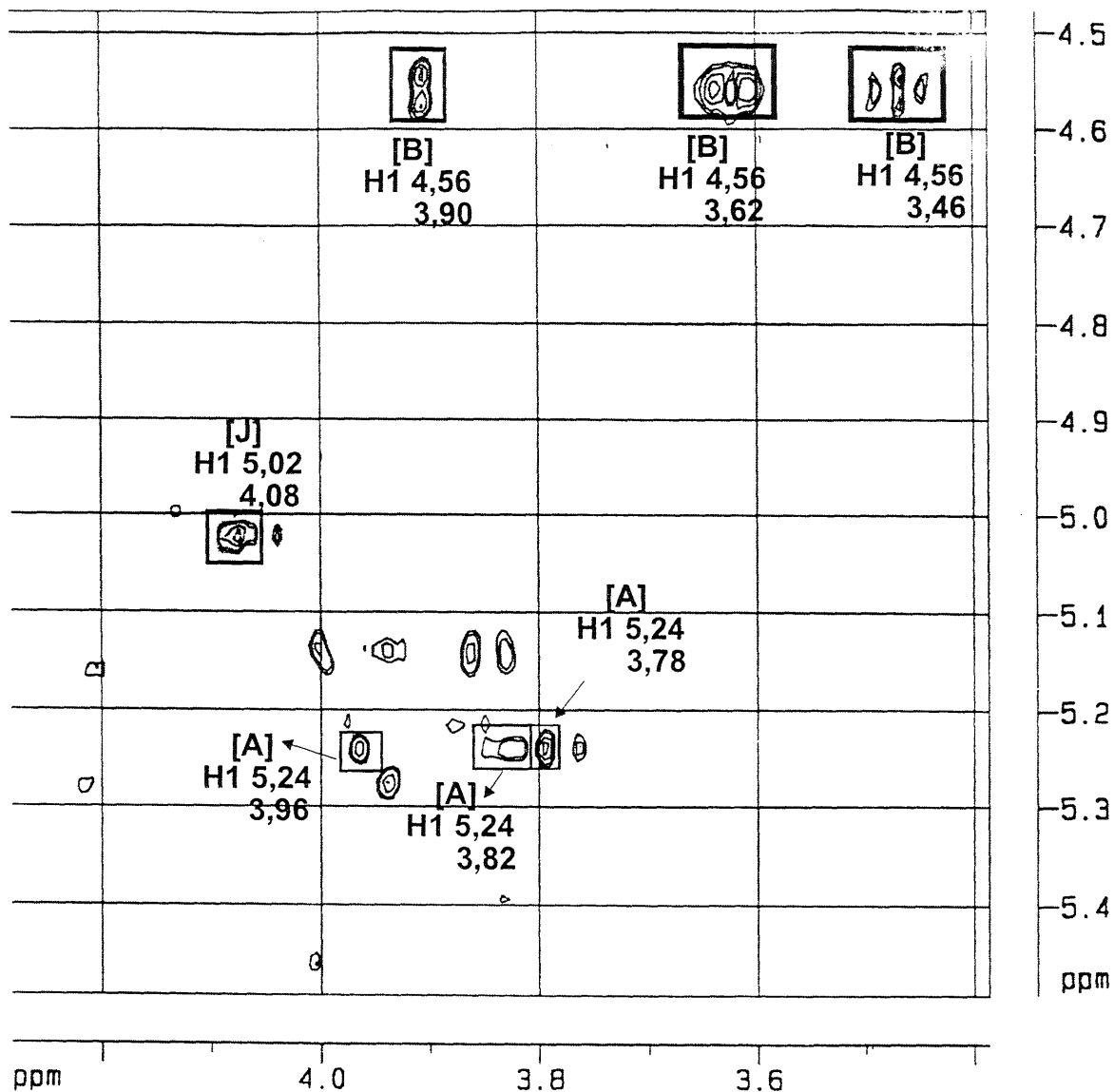


Figura 63: Espectro de RMN de correlação TOCSY [^1H - ^1H] da fração $\text{FH}_{1,30}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. A: α -D-Galp; B: β -D-Galp; J: α -L-Araf-(1 \rightarrow).

Para unidade de α -Galp correlacionou-se o sinal em δ 68,73 (C-2) com o sinal em δ 3,81(H-2) e em δ 68,1 (C-6, sinal invertido) com o sinal em δ 3,84. Em virtude de sobreposições não foi possível obter as correlações C-3/H-3, C-4/H-4 e C-5/H-5. Para unidade redutora de β -D-Galp, obteve-se as correlações entre os sinais em δ 72,3 (C-2) para δ 3,45 (H-2), em δ 73,1 (C-3) para δ 3,61 (H-3), em δ

74,1 (C-5) para δ 3,84 (H-5). O sinal invertido de C-6 em δ 67,8 correlaciona-se com o sinal em δ 3,74. Em virtude de sobreposições não foi possível obter as correlações de C-4 e H-4. As correlações estão mostradas no espectro (Figura 64).

No espectro de ROESY (Figura 65), obteve-se as correlações de H-1 da unidade de arabinose (δ 5,02) com o sinal em δ 3,74, corresponde ao H-6 da unidade de galactose (β), sinal este atribuído pelo espectro de HMQC.

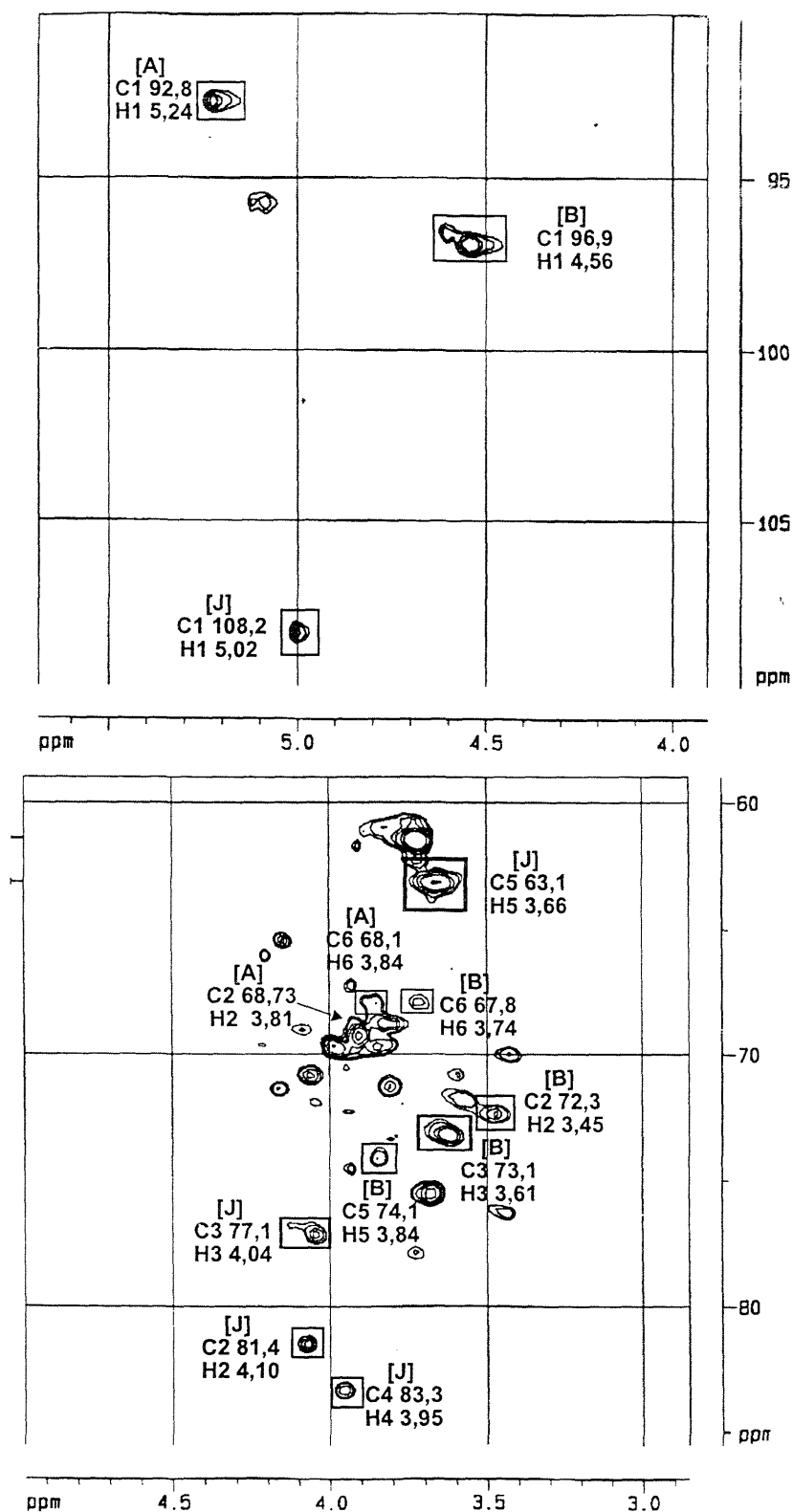


Figura 64: Espectro de RMN de correlação HMQC [^{13}C - ^1H] da fração $\text{FH}_{1,30}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm. A: α -D-Galp; B: β -D-Galp; J: α -L-Araf-(1 \rightarrow).

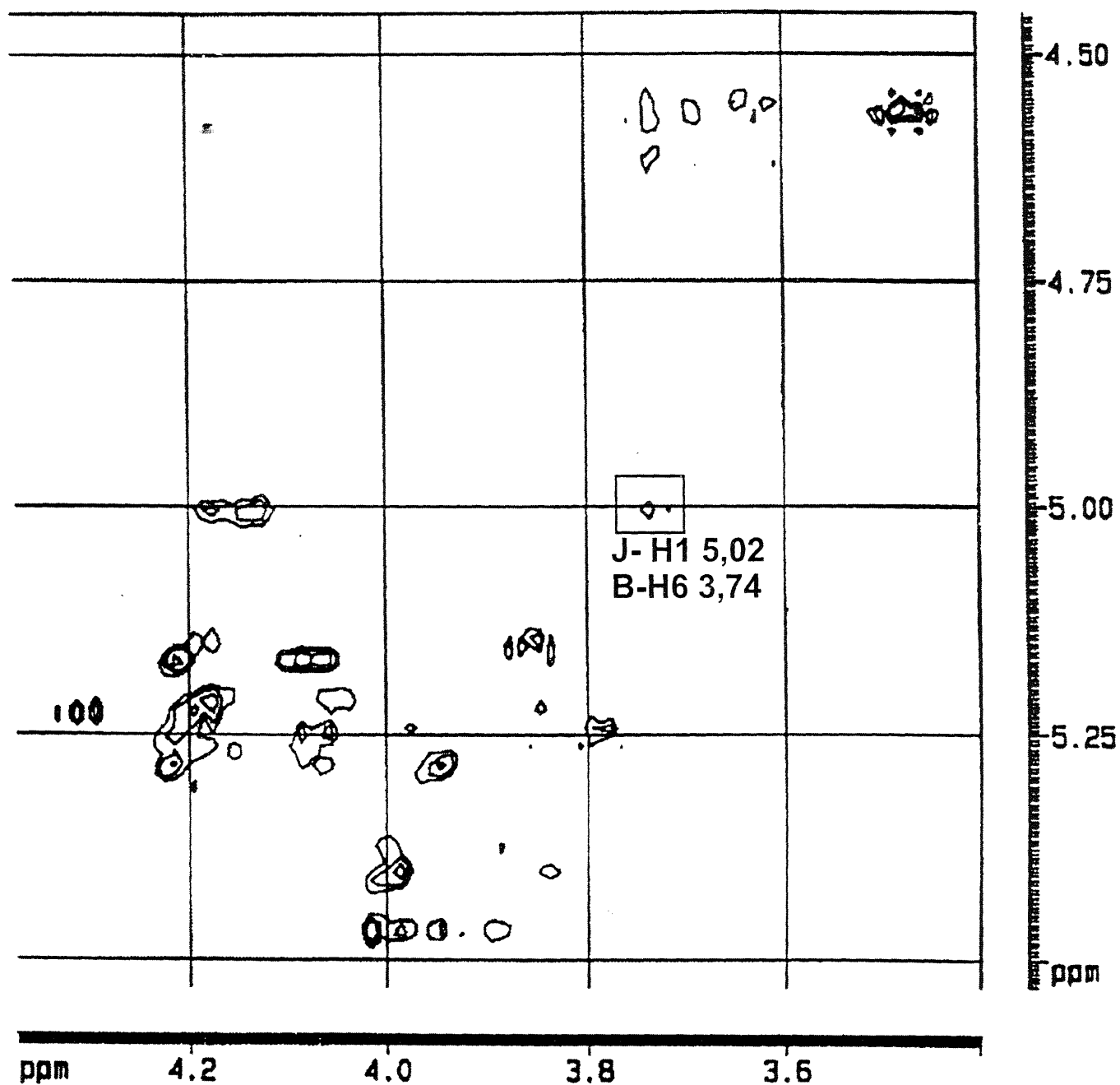


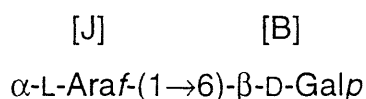
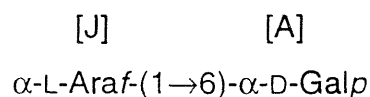
Figura 65: Espectro de RMN de correlação ROESY [^1H - ^1H] da fração $\text{FH}_{1,30}$, em D_2O , a 30°C .

* Os deslocamentos químicos estão expressos em δ ppm. A: α -D-Galp; B: β -D-Galp; J: α -L-Araf-(1 \rightarrow).

Pelos dados de composição monossacarídica e pelos assinalamentos dos espectros verifica-se nesta fração o dissacarídeo: α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp. Este dissacarídeo apresentou uma rotação específica de $[\alpha]_D +5^\circ$, confirmando a configuração α -L.

A fração FH_{1,30} obtida a partir da hidrólise ácida parcial do PN do exsudato vegetal do *A. occidentale*, corresponde ao dissacarídeo α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp, na Tabela XV estão apresentados os principais assinalamentos (em δ ppm) atribuídos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H .

Tabela XV: Assinalamentos (em δ ppm) da fração FH_{1,30} obtidos pelos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H .



Unidades		H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
[A]	$\rightarrow 6)$ - α -D-Galp	5,24	3,81				3,84
		92,8	68,73				68,1
[B]	$\rightarrow 6)$ - β -D-Galp	4,56	3,45	3,61		3,84	3,74
		96,9	72,3	73,1		74,1	67,8
[J]	α -L-Araf-(1 \rightarrow	5,02	4,10	4,04	3,95	3,66	
		108,2	81,4	77,1	83,3	63,1 (63,2)	

4.6.7 Frações FH_{1,00} e FH_{1,44}

As frações FH_{1,00} e FH_{1,44} não foram caracterizadas, apresentando espectro de RMN-¹³C complexos com 14 e 12 sinais, respectivamente.

Pelos espectros obtidos e pelos dados de composição monossacarídica, sugere-se que estas frações apresentam-se como misturas.

Assim, pelo procedimento de hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo foi possível caracterizar as seguintes estruturas: β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Gal (FH_{0,14}); β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Gal (FH_{0,32}); α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Gal e β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Gal (FH_{0,86}); β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- $\alpha\beta$ -D-Gal (FH_{1,15}); e α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Gal (FH_{1,30}), como ilustrado na Figura 66.

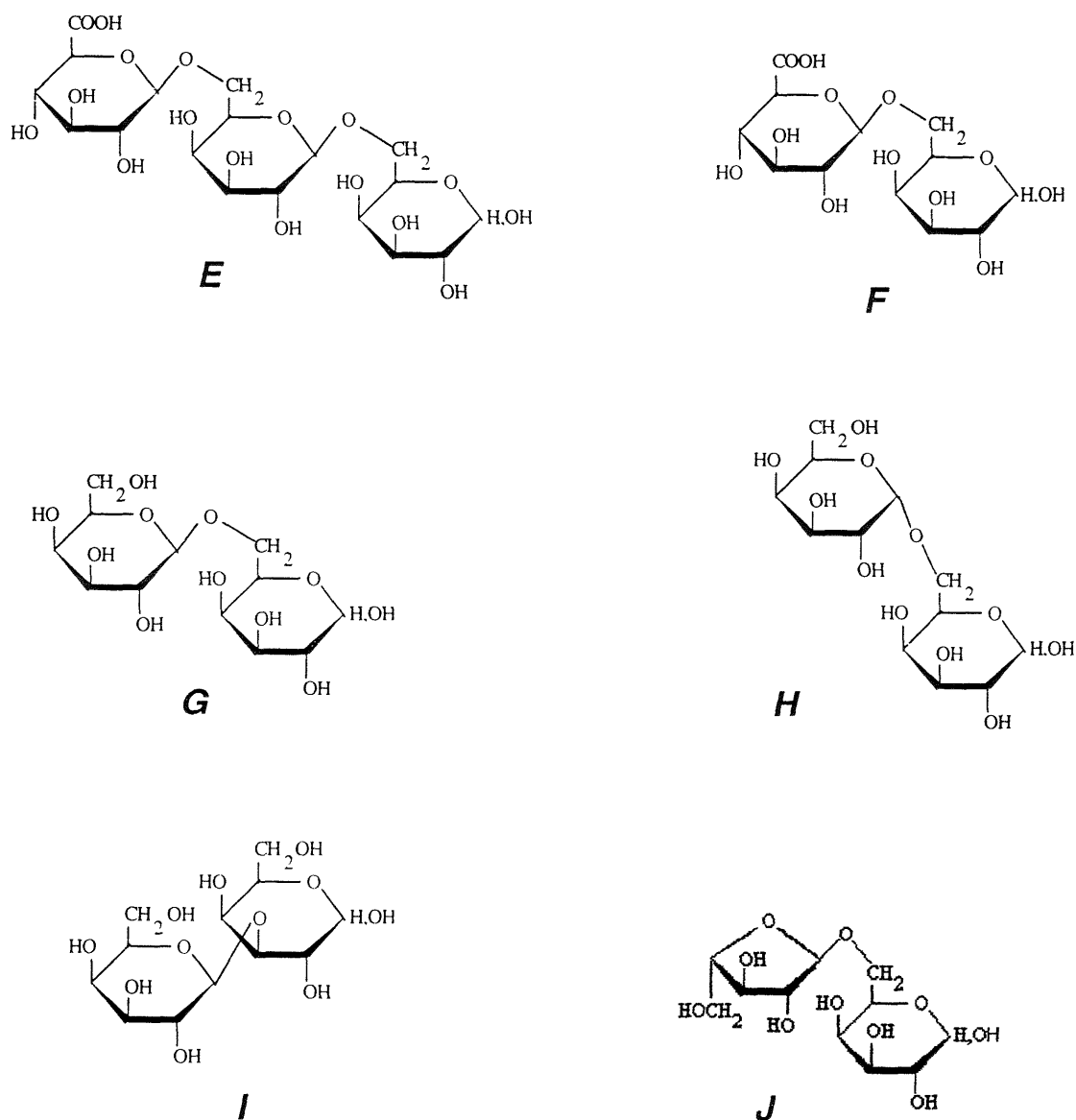


Figura 66: Estruturas químicas* dos oligossacarídeos provenientes da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal de *A. occidentale*.

* **E:** β-D-GlcpA-(1→6)-β-D-Galp-(1→6)-αβ-D-Gal; **F:** β-D-GlcpA-(1→6)-αβ-D-Gal; **G e H:** β-D-Galp-(1→6)-αβ-D-Gal e α-D-Galp-(1→6)-αβ-D-Gal; **I:** β-D-Galp-(1→3)-αβ-D-Gal; **J:** α-L-Araf-(1→6)-αβ-D-Gal.

Os dados de RMN de ^{13}C dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise parcial, foram importantes para o assinalamento das estruturas: $\beta\text{-Glc}p\text{A-(1}\rightarrow$ (δ 103,0); $\rightarrow 6\text{-}\beta\text{-Gal}p\text{-(1}\rightarrow 6$ (δ 103,8); $\alpha\text{-D-Gal}p\text{-(1}\rightarrow$ (δ 100,5); $\beta\text{-D-Gal}p\text{-(1}\rightarrow 3\text{)-}$ (δ 103,9) e $\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 6$ (δ 108,3), como mostrado, anteriormente, na Tabela XIII (página 176).

Além disso, por esses oligossacarídeos, pode-se determinar algumas cadeias laterais do polissacarídeo nativo, confirmando os dados de metilação e RMN dos polissacarídeos já relatados, mostrando a presença de galactose 3-*O* e 6-*O* substituídas, sendo que essas unidades estariam ligadas à unidades de ácido glucurônico, arabinose ou galactose.

4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação aos resultados apresentados para os mono- e oligossacarídeos livres redutores presentes no exsudato do cajueiro e para a caracterização da estrutura fina do polissacarídeo pode-se relatar que tanto os mono- como os oligossacarídeos livres redutores obtidos no sobrenadante etanólico estão presentes nas cadeias laterais do polissacarídeo nativo. Em virtude da similaridade, dos mono- e oligossacarídeos livres redutores com as cadeias laterais do polissacarídeo nativo, pode-se supor que essas moléculas seriam originadas por enzimólise *in situ* ou de produtos intermediários de biossíntese deste polissacarídeo. Porém, para comprovar esta última hipótese, são necessários estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de biossíntese de polissacarídeos de exsudatos vegetais *in vitro*.

Pelos resultados da caracterização química do polissacarídeo nativo do exsudato de origem brasileira (Caruaru - PE), este apresentou uma estrutura altamente ramificada consistindo de uma cadeia principal de β -D-Galp (1 \rightarrow 3) ligada, substituída em O-6 por várias cadeias laterais. As cadeias laterais contendo arabinose são longas, uma vez que 3 degradações controlada de Smith foram insuficientes para remover todas elas, e pelos resultados obtidos nos espectros de RMN, estas não são estruturas α -Araf, as quais podem ser identificadas por sinais característicos de C-1 na região de δ 110-108. Pelos dados de composição monossacarídica e da caracterização da estrutura química obtidos, este polissacarídeo pode ser classificado de acordo com ASPINALL (1969; 1983), no grupo das D-galactanas (sub-grupo arabinogalactanas tipo II) e de acordo com STEPHEN (1983), no grupo das arabinogalactanas. Porém, considerando-se que este é um heteropolissacarídeo apresentando conteúdo baixo de arabinose (4%), sugere-se a classificação como uma heterogalactana ácida.

Comparando-se com o polissacarídeo da goma coletada na Índia (ANDERSON & BELL, 1975), a estrutura é muito similar, especialmente a cadeia principal de unidades β -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 3), as quais algumas estão substituídas em O-6 por cadeias laterais. As cadeias laterais parecem mais longas, contendo unidades de β -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6), algumas de Araf ligadas (1 \rightarrow 2) com mais de 5 unidades, necessitando de 5 degradações controlada de Smith para completa remoção, e unidades terminais não redutoras de Arap, Araf, Glcp, Rhap, Manp, Xylp, e β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)-D-Galp. Foi verificada a ausência de unidades de 4-O-Me-GlcpA no polissacarídeo brasileiro. As outras

diferenças parecem ser devido a disponibilidade dos autores à técnicas mais sofisticadas, especialmente as análises de metilação e espectroscopia de RMN. Como exemplo, na determinação da presença do derivado 4-*O*-metil glucurônico e na caracterização de unidades terminais não redutoras como α -L-Rhap-(1→4)- β -D-GlcpA-(1→6)- β -D-Galp e α -L-Araf-(1→6)-D-Galp.

Comparando-se com os dados de RMN e composição monossacarídica do polissacarídeo da goma de cajueiro de origem brasileira (Ceará) estudado por DE PAULA *et al.* (1998), o polissacarídeo do cajueiro estudado na presente tese apresentaram similaridade, principalmente, em relação a cadeia principal galactose 3-*O*-substituídas, como foi observado nos espectros, pelas ressonâncias de C-1 de unidades de galactopirranose, além da ausência do derivado ácido 4-*O*-metil-glucurônico.

Com relação aos estudos de exsudatos vegetais de outros gêneros da família Anacardiaceae, descritos na literatura (ANDERSON & HENDRIE, 1972; ANDERSON & HENDRIE, 1973; BASU, 1980; GHOSAL & THAKUR, 1981; PEREZ *et al.*, 1995; LÉON DE PINTO *et al.*, 1996), destaca-se que todos os polissacarídeos apresentam-se como arabinogalactanas ácidas, e que a ocorrência dos três tipos de urônicos (ácido galacturônico, ácido glucurônico e/ou ácido 4-*O*-metil glucurônico) no mesmo polissacarídeo não é uma característica geral para esta família.

A maioria dos exsudatos vegetais descritos na literatura (WHISTLER & ROWELL, 1966; CAFFINI & PRIOLO DE LUFRANO, 1974, 1975; ASPINALL, 1969, 1983; STEPHEN, 1983) apresentam polissacarídeos como arabinogalactanas ácidas, porém, pode-se destacar que existem polissacarídeos de exsudatos vegetais que

apresentam estruturas de ramnogalacturonanas, como a goma karaia (ASPINALL, 1969), de xilogalacturonanas, como a goma tragacanto (ácido tragacântico) (ASPINALL, 1969) e de arabinoxilanas ácidas, como por exemplo, o polissacarídeo do exsudato vegetal de *Cercidium praecox* (LÉON DE PINTO *et al.*, 1994), de *Livistona chinensis* (MENESTRINA *et al.*, 1996) e de *Syagrus rommanzofianum* (REIS *et al.*, 1998).

O *Anacardium occidentale* (cajueiro) apresenta inúmeras aplicações do ponto de vista econômico, principalmente agrícola, incluindo o fruto (castanha de caju), o pseudofruto (porção carnosa), e a madeira obtidos desta árvore (HOENE, 1939; FLEIG, 1989; LEPREVOST, 1998). Além disso, o óleo da castanha, que já é utilizado na indústria química, pode ter um potencial interesse biológico (KUBO *et al.*, 1993; TOYOMIZU *et al.*, 1993; MARMORI, 1994; LEPREVOST, 1998).

O exsudato vegetal do cajueiro tem alto potencial para ser aplicado em diferentes indústrias do mesmo modo que a goma arábica (LEPREVOST, 1998). Estudos preliminares mostram que este polissacarídeo pode ter também, no futuro, outras aplicações biológicas (PEREIRA-NETTO *et al.*, 1998).

Então, *Porque não o cajueiro* ?. Faço minhas as palavras do Prof. A. LEPREVOST, o qual em um comentário (*Informativo CRQ*, 1998) sobre as inúmeras características que apresentam o cajueiro questiona porque não investe-se mais nesta cultura, tanto a nível de Paraná como de Brasil.

5. CONCLUSÕES

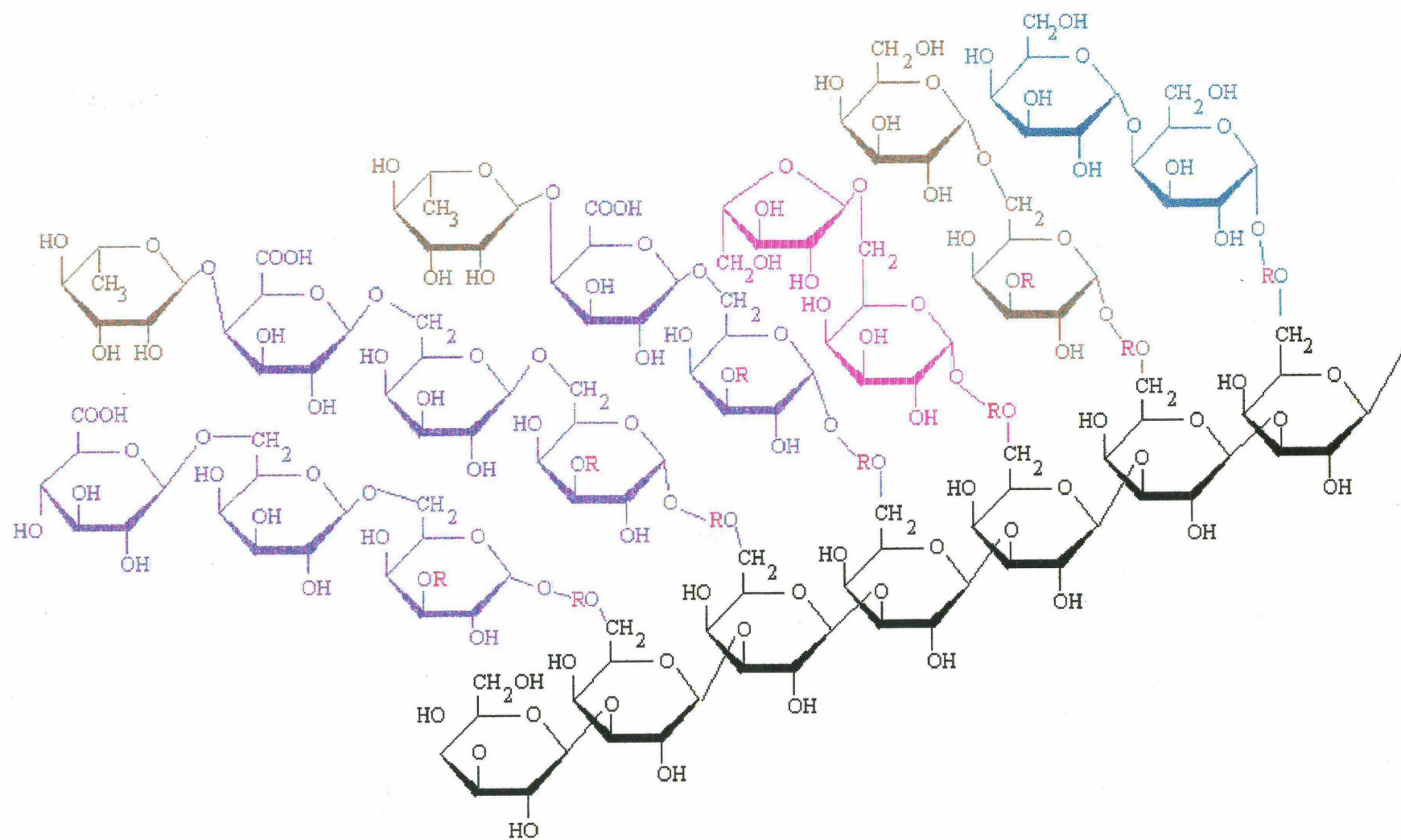
1. O exsudato vegetal de *Anacardium occidentale* (cajueiro) apresenta 0,87% de carboidratos de baixa massa molecular e 80% de polissacarídeo.
2. Os componentes de baixa massa molecular são constituídos de monossacarídeos livres, como ramnose (0,005%), arabinose (0,03%), manose (0,007%), galactose (0,03%) e glucose (0,02%) e de oligossacarídeos redutores, como β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0,05%), α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-Glc pA (0,008%), α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc pA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0,01%) e α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc pA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp (0,008%).
3. O polissacarídeo do exsudato vegetal de *A. occidentale* apresentou os valores para massa molecular média em massa (M_w) de $1,12 \times 10^5$ ($\pm 0,03$) e para a massa molecular média em número (M_n) de $9,62 \times 10^4$ ($\pm 0,30$) e de polidispersividade de $1,165 \pm 0,045$, característico de uma fração homogênea.
4. A composição monossacarídica do polissacarídeo nativo do exsudato vegetal do cajueiro é de ácido glucurônico (5%), arabinose (4%), gaiactose (82%), glucose (6%), ramnose (2%) e xilose (1%), caracterizando-o como uma heterogalactana ácida.

5. Pelos resultados obtidos nas análises de metilação e por espectroscopia de RMN dos polissacarídeos: PN, PPH, PPHDS1, PDS1, PDS2 e PDS3, verificou-se que o polissacarídeo nativo do cajueiro é constituído por uma cadeia principal de unidades de β -D-galactopiranosose unidas por ligação do tipo (1 \rightarrow 3), substituídas em O-6 por várias cadeias laterais, indicando que esta unidade participa de vários tipos de ligações dentro do polímero. As unidades de arabinofuranose, ramnospiranosose e ácido glucurônico presentes estão num ambiente mais uniforme na molécula.

6. O polissacarídeo do cajueiro apresenta cadeias laterais, como, $-\beta$ -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp-, $-\alpha$ -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp-, α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)-D-Galp-, β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Gal e β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- α β -D-Galp.

7. Propõe-se a seguinte estrutura esquematizada para o polissacarídeo do exsudato vegetal de *A. occidentale*:

* Em preto está representada a cadeia principal. R: representa cadeias de D-galactose ligadas em (1 \rightarrow 3) ou em (1 \rightarrow 6).



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINOLFI, M.; CORSARO, M.M.; MANGONI, L.; PARRILI, M.; POERIO, E.

Studies of an acidic polysaccharide from *Encephalartos friderici guilielmi*.

Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 222, p. 215-221, 1991.

AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of

oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, p. 3307-

3330, 1992.

ANDERSON, D. M. W., BELL, P. C. Structural analysis of the gum polysaccharide

from *Anacardium occidentale*. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 79, p. 185-

197, 1975.

ANDERSON, D. M. W., BELL, P. C., MILLAR, J. R. A. Composition of gum

exudates from *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 13, p.

2189-2193, 1974.

ANDERSON, D. M. W.; DEA, I. C. M. Chemotaxonomic aspects of the chemistry

of *Acacia laeta* gum, **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 7, p. 320-333, 1969.

ANDERSON, D. M. W.; HIRTS, 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.; HIRTS, 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.

ANDERSON, D.M.W.; DEA, I.C.M.; SMITH, R.N. Studies on uronic acid materials. Part XXIX. Some structural aspects of *Acacia laeta* gum. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 7, p. 320-333, 1968.

ANDERSON, D.M.W.; FARQUHAR, J.G.K. The composition of eight exudates from the series Gummiferae and Vulgares. **Phytochemistry**, Oxford. v. 118, p. 609-610, 1979.

ANDERSON, D.M.W.; GILL, M.C.L. The composition of *Acacia* gum exudates from species of the subseries Juliflorae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 14, p. 739-741, 1975.

ANDERSON, D.M.W.; HENDRIE, A. The structure of *Lannea humilis* gum. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 22, 265-279, 1972.

ANDERSON, D.M.W.; HENDRIE, A. The structure of *Lannea coromandelica* gum. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 26, 105-115, 1973.

ANDERSON, D.M.W.; MUNRO, A.C. The structure of *Acacia campylacantha* gum. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 12, p. 9-22, 1970.

ANDERSON, D.M.W.; WEIPING, W.; LEWIS, G.P. The composition and properties of eight gum exudates (Leguminosae) of American origin. **Biochem. Systemat. Ecol.**, Oxford, v.18, n.1, p.39-47, 1990.

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

ASPINALL, G. O. General introduction. In: **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982a. v. 1, p. 1-18.

ASPINALL, G. O. Isolation and fractionation of polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982b. v. 1, p. 19-26.

ASPINALL, G. O. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982c. v. 1, p. 36-131.

ASPINALL, G. O. Classification of polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. v. 2, p. 1-9.

ASPINALL, G.O.; JOHNSTON, M.J.; YONG, R. Plant gums of the genus *Khaya*.

Part. III. The minor component of *Khaya senegalensis* gum. **J. Chem. Soc.**, London, p. 2701-2710, 1965.

BANDEIRA, C.T. **Relatório Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - CNPCa**, v. 6, p. 1-2, 1991.

BASU, S. Some structural studies on degraded *Spondias dulcis* gum. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 81, p. 200-201, 1980.

BEAUQUESNE, L.B.; PINKAS, M.; TROTIN, F. Gommages et mucilages uroniques, **Revue Ann. Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 40, n. 2, p. 179-190, 1982.

BEMILLER, J. N. **Industrial gums**. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, John Wiley & Sons, v. 7, 589 p., 1987.

BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R.L.; BARKALOW, D.G.; CHEN, -C. Aloe. chia, flaxseed, okra, psyllium seed, quince seed, and tamarind gums. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. New York: Academic Press, 3^a ed, 1993, p. 227-256.

- BERGER, J.R.; LESTER, D. Water soluble polymers. In: DAVIDSON, R.L.; SITTIG, M. **Water soluble resins**. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1962, p.1-20.
- BIGGE, J.C.; PATEL, T.P.; BRUCE, J.A.; GOULDING, P.N.; CHARLES, S.M.; PAREKH, R.B. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. 230, 229-238, 1995.
- BILLMEYER, F.M. Jr. Measurements of molecular weight and size. In: **Textbook of Polymer Science**, New York: John Wiley and Sons, 1962, p.64.
- BILLMEYER, F.M. Jr. **Textbook of Polymer Science**, New York: John Wiley and Sons, 2. ed., 1971, p. 83.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. 54. p. 484-489, 1973.
- BOCK, K.; PEDERSEN, C.. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, New York. v.41, p. 27-66, 1983.

BOSE, S.; BISWAS, S.Y. *Anacardium occidentale* gum. I. Immunological and hydrolysis studies. **Indian J. Biochem.**, Calcutta, v. 7, p. 68, 1970.

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.**, Duluth, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, 1990, 194 p.

BYRD, A.; EGAN, W.; SUMMERS, M.F.; BAX, A.D. New NMR-spectroscopic approaches for structural studies of polysaccharides application to the *Haemophilus influenzae* Type a capsular polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 166, p. 47-58, 1987.

CAFFINI, N.O.; PRIOLO DE LUFRANO, N.S. Composicion de gomas y mucilagos de plantas superiores. **Revista Farmaceutica**, Buenos Aires. v.116. p. 95-105, 1974.

CAFFINI, N.O.; PRIOLO DE LUFRANO, N.S. Composicion de gomas y mucilagos de plantas superiores (continuacion). **Revista Farmaceutica**, Buenos Aires, v.117, p. 38-45, 1975.

CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. (eds.)

Carbohydrates Analysis: A practical approach. Oxford: IRL Press, 1994.

2^a ed, p. 1-40.

CHARLSON, A.; J.; STEPHEN, A. M.; RAVENSCROFT, N. The acetolysis of reduced *Acacia saligna* (syn. *cyanophylla*) gum exudate. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 68, p. 1004-1006, 1990.

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

COLLINS, J.G., BRADBURY, H., TROFINOFF, E., MESSER, M. Structures of four new oligosaccharides from marsupial milk, determined mainly by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 92, p. 136-140, 1981.

COLSON, P.; JENNINGS, H.J.; SMITH, I.C.P. Composition, sequence and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon-13 nuclear magnetic resonance, **J. Am. Chem. Soc.**, London, v. 96, p. 8081-8087, 1974.

COSTA, S.M.O.; RODRIGUES, J.F.; DE PAULA, R.C.M. Monitorização do processo de purificação de gomas naturais: goma do cajueiro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, abr/jun, p. 49-55, 1996.

DABROWSKI, J. Two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy. In: KAPLAN, N. O., COLOWICK, S. P. (eds.) **Methods Enzymol.**, New York : Academic Press, 1989, v. 179, p. 122-164.

DE PAULA, R. C.M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydr. Polymers**, Barking, v. 26, p. 177-181, 1995.

DE PAULA, R.C.M.; HEATLEY, F.; BUDD, P.M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, Chichester, v. 45, p. 27-35, 1998.

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. **Estudo parcial do polissacarídeo do exsudato de *Anadenanthera colubrina* (angico branco)**. Tese de mestrado. Dep. Bioquímica, UFPR, 1993, 125 p.

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

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TORRI, G.; IACOMINI, I. Characterization of the polysaccharide and oligosaccharide of the gum exudate from *Anadenanthera colubrina*. In: **Anais da XXIIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, 1994, L27, p.123.

DELL, A.; REASON, A. J.; KHOO, K. H.; PANICO, M.; McDOWELL, R. A.; MORRIS, H. R. Mass-spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers. In: KAPLAN, N. O., COLOWICK, S. P. (eds.) **Methods Enzymol.**, New York: Academic Press, 1994, v. 230, p. 108-132.

DINAND, E.; EXCOFFIER, G.; LIÉNART, Y.; VIGNON, M.R. Two rhamnogalacturonide tetrasaccharides isolated from semi-retted flax fibers are signaling molecules in *Rubus fruticosus* L. cells. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 115, p. 793-801, 1997.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. 28, p. 350-356, 1956.

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. **Methods Biochem. Analysis**, New York: Academic Press, v. 3, p. 111-152. 1956.

EDMONDS, C.G.; SMITH, R.D. Electrospray ionization mass spectrometry. In: McCLOSKEY, J.A. (ed.) **Methods Enzymol.**, São Diego: Academic Press, 1990, v. 193, p. 412-431.

EWING, G. M. Polarimetria e dispersão óptico-rotatória. Em: **Métodos instrumentais de análise química**, São Paulo: Edgard Blucher, v. 1, p. 189, 1982.

FINCHER, G.B.; STONE, B.A. Metabolism of noncellulosic polysaccharides. In: TANNER, W.; LOEWUS, F.A. (eds.) **Encyclopedia of plant physiology, New Series**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. v. 13B, p. 68-132.

FINCHER, G.B.; STONE, B.A.; CLARKE, A.E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto. v. 34. p. 47-70, 1993.

FLEIG, M. Anacardiáceas. **Flora Catarinense**, Itajaí, p. 3-62, 1989.

GANE, A.M.; CRAIK, D.; MUNRO, S.L.A.; HOWLETT, G.J.; CLARKE, A.E.; BACIC, A. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 277, p. 67-85, 1995.

GEYER, R., GEYER, H. Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. In: KAPLAN, N. O., COLOWICK, S. P. (eds.) **Methods Enzymol.**, New York : Academic Press, 1994, v. 230, p. 86-108.

GHOSAL, K. P.; THAKUR, S. Structural features of the acidic polysaccharide of *Spondias pinnata* gum exudate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 98, p. 75-83, 1981.

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

GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, New York. v. 38. p. 13-104, 1981.

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

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 128, p.119-132. 1984.

- GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; FEIJÓ, M.A.L.; ZANIN, S.M.W.; HOGGE, L. Assignment of absolute configuration of monosaccharide components of complex heteropolysaccharides by G.L.C.-M.S. of derived acetylated (-)-2-octyl glycosides. **Arquiv. Biol. Tecnol.**, Curitiba (Paraná), v. 28, n. 3, p.387-398, 1985.
- GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}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, n. 1, p. 325-333, 1996.
- HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. Chem. Soc.**, London, v. 107, p. 8-16, 1915.
- HAY, G. W., LEWIS, B. A., SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 5, p. 357- 360. 1965.
- HOEHNE, F.C **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars. 1939, p. 355.

HOUGH, L. ; JONES, J. K. N. Chromatography on paper. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, 1962, v. 1, p. 21-31.

HOUGH, L.; JONES, J. K. N.; WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. **J. Chem. Soc.**, London, p. 1702-1706, 1950.

JAMES JR., D.W.; PREISS, J.; ELBEIN, A.D. Biosynthesis of polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (ed.), **The Polysaccharides**, New York: Academic Press, 1985. v. 3, p. 107-196.

JONES, C. NMR Studies of phosphoinositol oligosaccharides from protozoa, **Ciência Cultura**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 262-272, 1994.

JONES, J. K. N., SMITH, F. Plant gums and mucilages. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 4, p. 243-251, 1949.

JOSELEAU, J. P.; ULLMANN, G. Biochemical evidence for the site of formation of gum arabic in *Acacia senegal*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, p. 3401-3405, 1990.

KANDLER, O.; HOPF, H. Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (eds.). **The biochemistry of plants a comprehensive treatise - Carbohydrates: structure and function**, New York: Academic Press, 1980, v. 3, p. 221-266.

KAPOOR, V. P., FAROOQI, M. T. H., TARAVEL, F. R., JOSELEAU, J. P. Studies on *Acacia nilotica* gum exudates. Structural variation due to different habitats. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 222, p. 289- 293, 1991.

KREUGER, M.; VAN HOLST, G-J. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. **Planta**, Heidelberg, v. 189, p. 243-248, 1993.

KUBO, I.; OCHI, M.; VIEIRA, P.C.; KOMATSU. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, 1012-1015, 1993.

KUHN, R., TRISCHMANN, M., LÖW, I. Zür permethylierung von zuckern und glikosiden. **Angew. Chem.**, Weinheim, v. 67, p. 32, 1955.

LEMIEUX, R. U. Celite column chromatography. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, 1962, v. 1, p. 45-47.

LEÓN DE PINTO, G. Carbon-13 n.m.r.-spectral study of *Acacia xanthophloea* gum and its degradation products. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 220, 229-242, 1991.

LEÓN DE PINTO, G.; MARTINEZ, M.; MENDOZA, J.A.; AVILA, D.; OCANDO, E.; RIVAS, C. Structural study of the polysaccharide isolated from *Spondias purpurea* gum exudate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 290, 97-103, 1996.

LEÓN DE PINTO, G.; MARTINEZ, M.; MENDOZA, J.A.; OCANDO, E.; RIVAS, C. Comparison of three Anarcadiaceae gum exudates. **Biochem. System. Ecology**, Oxford, v. 23, n. 2, 151-156, 1995.

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

LEPREVOST, A. Porque não o cajueiro?. **Boletim Informativo do Conselho Regional de Química - 9**, Curitiba (PR), ano 4, jul.-set., p. 03, 1998.

LIMA, V. de P.M.S. **Cultura do cajueiro no nordeste do Brasil**, Banco do Nordeste do Brasil, ETENE, Fortaleza, Ceará, Brasil, p. 405-421. 1988.

LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J.; THOMPSON, J.L.; NIMMICH, W. Structural studies of the *Klebsiella* type 9 capsular lysaccharide. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 25, p. 49-57, 1972.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C.; MAGNUSON, K.; WHISTLER, R.L. Guar, locust bean, tara, and fenugreek gums. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. New York: Academic Press, 3^aed, 1993, p. 181-226.

MARMORI, M. Cajueiro contra leucemia. **Ciência Hoje**, Brasília, v. 17, n. 97, p. 74, 1994.

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

McNEIL, M., DARVILL, A. G., AMAN, P., FRANZÉN, L. E., ALBERSHEIM, P. Structural analysis of complex carbohydrates using high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and mass spectrometry. In: KAPLAN, N. O., COLOWICK, S. P. (eds.) **Methods Enzymol**, New York : Academic Press, 1982, v. 83, p. 3-45.

- MENESTRINA, J.M.; SASSAKI, G.L.; TORRI, G.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.
Partial structural characterization of the heteropolysaccharide from *Livistona chinensis* gum. In: **Anais da XXVª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, 1996, L56, p. 116.
- MERKLE, R. K.; POPPE, I. Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by gas-liquid chromatography/mass spectrometry. In: KAPLAN, N. O., COLOWICK, S. P. (eds.) **Methods Enzymol.**, New York : Academic Press, 1994, v. 230, p. 1-15.
- MOLLARD, A.; JOSELEAU, J.P. *Acacia senegal* cells cultured in suspension secrete a hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein. **Plant Physiol. Biochem.**, Paris, v. 32, n. 5, p. 703-709, 1994.
- MOORHOUSE, R. Structure/properties relationships of a family of microbial polysaccharides. In: YALPANI, M. (ed.) **Industrial polysaccharides: genetic engineering, structure/ properties relations and applications**. Amsterdam: Elsevier, p. 187-206, 1987.
- NAIR, G. M.; VENKAIAH, K.; SHAH, J. J. Ultrastructure of gum-resin ducts in cashew (*Anacardium occidentale*). **Ann. Bot.**, London, v. 51. p. 297-305, 1983.

ODONMAZIG, P.; EBRINGEROVÁ, A. ; MACHOVÁ, E.; ALFÖLDI, J. Structural and molecular properties of the arabinogalactan isolated from Mongolian larchwood (*Larix dahurica* L.). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 252, p. 317-324, 1994.

PEREIRA-NETTO, A.B.; CARNEIRO LEÃO, A.M.A.; ALQUINI, Y.; MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M. Changes on the differentiation pattern of carrot cells induced by a sulphated alpha-D-glucan and an arabinogalactan. In: **The American Society of Plant Physiologists**, 1998, Abstract n. 601.

PEREZ, G.R.M.; SANCHEZ, A.J.; PEREZ, G.S.; VARGAS, S.R. An analytical study of gums from *Leucaena glabrata* e *Spondias purpurea*. **Sci. Food Agric.**, Barking, v. 68, n. 1, p. 39-41, 1995.

PIGMAN W., ISBELL, H.S. Mutarotation of sugars in solution: Part I. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 23, p.11, 1968.

READ, S.M.; CURRIE, G.; BACIC, A. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionization-mass spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 281, p. 187-201, 1996.

REICHER, F.; CÔRREA, J.B.C.; GORIN, P.A.J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scrabella* (Bracatinga). A study of O-acetyl group migration. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 135, p. 129-140, 1984.

REIS, R.A.; MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J. Partial structural characterization of the heteropolysaccharide from *Syagrus rommanzofianum* Cham. (Gerivá). In: **Anais da XXVIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, 1998, L-14, p. 115.

RINAUDO, M. Polysaccharide characterization in relation with some original properties. **J. App. Polymer Sci.: Applied Polymer Symposium**. v. 52, p. 11, 1993.

RODRIGUES, J. F., DE 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**, ano III, n. 1, p. 31-36, 1993.

ROSENTHAL, F.R.T. Estudos sobre a constituição de algumas gomas nacionais. **Rev. Quim. Ind.**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 17-19, 1955.

RYAN, C.A.; FARMER, E.E. Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.**, Palo Alto, v. 42, p. 651-674, 1991.

SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (ed.), **The Polysaccharides**, New York: Academic Press, 1983. v. 2, p. 421-485.

SLNEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 6, p. 20-24, 1972.

SMITH, C.J. Carbohydrate chemistry. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. (eds.). **Plant biochemistry and molecular biology**, Chichester: John Wiley & Sons, 1993, p. 73-111.

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, 1959, p.1-13.

SMITH, R.J.. Determination of moisture and ash. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 4, p. 36-42, 1964.

STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J. **The oligosaccharides**. In: ERNEST, I; HEEBKY, J. (eds.) New York: Academic Press, 1965, 567 p.

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

TOYOMIZU, M.; SUGIYAMA, S.; JIN, R.L.; NAKATSU, T. α -Glucosidase and aldose reluctance inhibitors: constituents of cashew *Anacardium occidentale* nutshell liquid. **Phytother. Res.**, Chichester, v. 7, p. 252-254, 1993.

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

Van HALBEEK, H. ^1H Nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbohydrate chains of glycoproteins. In: KAPLAN, N. O., COLOWICK, S. P. (eds.) **Methods Enzymol.**, New York : Academic Press, 1994, v. 230, p. 132- 168.

VARGAS-RECHIA, C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; HEYRAUD, A.; DRIGUEZ, H.; LIÉNART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 116, p. 1013-1021, 1998.

WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N. Carbon column chromatography. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, 1962a, v.1, p. 42-44.

WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N. Cellulose column chromatography. In:
WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L.(eds.) **Methods Carbohydr. Chem.** New
York: Academic Press, 1962b, v.1, p. 47-50.

WHISTLER, R.L. Introduction. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Industrial
gums: polysaccharides and their derivatives**. New York: Academic Press,
3^aed, 1993a, p. 1-19.

WHISTLER, R.L. Exudate gums. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Industrial
gums: polysaccharides and their derivatives**. New York: Academic Press,
3^aed, 1993b, p. 309-339.

WHISTLER, R.L.; ROWELL, R.M. Chemistry of polysaccharides containing
glucuronic acid. In: DUTTON, G.J. (ed.). **Glucuronic acid free and
combined**. New York: Academic Press, 1966, p. 137-174.

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

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

ZAKARIA, M.B.; RAHMAN, Z. A. Rheological properties of cashew gum.

Carbohydr. Polym., Barking, v. 29, n. 1, 25-27, 1996.

7. ANEXO - PUBLICAÇÃO



SIMILARITY OF MONOSACCHARIDE, OLIGOSACCHARIDE AND POLYSACCHARIDE STRUCTURES IN GUM EXUDATE OF *ANACARDIUM OCCIDENTALE*

JULIANA M. MENESTRINA, MARCELLO IACOMINI, CHRISTOPHER JONES* and PHILIP A. J. GORIN†

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19046, 81531-990, Curitiba-PR, Brazil;

*National Institute for Biological Standards and Controls, South Mimms, Potters Bar, Herts. EN6 3QG, U.K.

(Received 17 April 1997)

Key Word Index—*Anacardium occidentale*; Anacardiaceae; cashew-nut tree; gum; polysaccharide; monosaccharides; oligosaccharides.

Abstract—The gum exudate from the Brazilian cashew-nut tree (*Anacardium occidentale*) contained traces of the reducing sugars, rhamnose (0.005%), arabinose (0.03%), mannose (0.007%), galactose (0.03%), glucose (0.02%), β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Gal (0.05%), α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcA (0.008%) and α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Gal (0.008%). Rhamnose, arabinose, glucose and the three oligosaccharides are components of the side-chains of the gum polysaccharide, which has a main chain of (1 \rightarrow 3)-linked β -D-Galp units. The structure of this polysaccharide was determined and found to differ from that previously reported for the gum of a tree growing in India, lacking units of 4-*O*-methylglucuronic acid. Other new side-chain structures were characterized, particularly α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp- and α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)-D-Galp-. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

INTRODUCTION

We recently detected free, reducing monosaccharides and oligosaccharides in the gum exudate of the tree, *Anadenanthera colubrina*, and compared them structurally with the accompanying polysaccharide in order to suggest mechanisms for their formation [1–3]. There were similarities with the monosaccharides and one oligosaccharide which were isolated and identified, but difficulties were encountered in the purification of the others. The gum of the Brazilian cashew-nut tree (*Anacardium occidentale*) was also found to contain monosaccharides and oligosaccharides, albeit in smaller quantities [4], and the structures of the monosaccharides and more readily purified oligosaccharides are now determined and their structures also compared with those present in the component polysaccharide.

However, prior to carrying out this comparison, it was necessary to re-determine the complex structure of the gum polysaccharide. It had been previously examined in 1974 and 1975 using samples collected in India and Papua (the cashew tree is native to America) [5, 6]. Rhamnose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose and glucuronic acid were found in molar ratios of 7:14:2:2:61:8:6 and 7:15:0:1:63:9:6,

respectively. The more detailed analysis of the Indian gum polysaccharide showed a highly branched structure, with a (1 \rightarrow 3)-linked β -D-Galp main chain [6] and that 4-*O*-methyl-glucuronic acid units were present. However, these data differed from those found in our examination of our polysaccharide, isolated from a Brazilian sample, which contained less arabinose with a 2:4:1:82:6:5 molar ratio of rhamnose, arabinose, xylose, galactose, glucose and glucuronic acid, and without 4-*O*-methylglucuronic acid, as evidenced by the absence of -OCH₃ signals in ¹H and ¹³C NMR spectra. We now report a detailed analysis of the polysaccharide.

RESULTS AND DISCUSSION

The polysaccharide of the Brazilian gum was isolated *via* ethanol precipitation of an aqueous solution and had $[\alpha]_D + 21^\circ$, M , 1.1×10^5 (light-scattering), and gave rise to a well-defined ¹H [H-1 portion, Fig. 1(A)] and ¹³C NMR spectra [Fig. 1(B)]. Methylation analysis and GC-mass spectrometric examination of the resulting partially *O*-methylated acetal acetates showed non-reducing end-units of Araf (2%), Rhap (2%), Glcp (<10%) and Galp (19%), and other Galp residues that were 3-*O*- (6%), 4-*O*- (10%), 6-*O*- (19%) and 3,6-di-*O*-substituted (32%) (Table 1). When the per-*O*-methylated polysaccharide was reduced with

† Author to whom correspondence should be addressed.

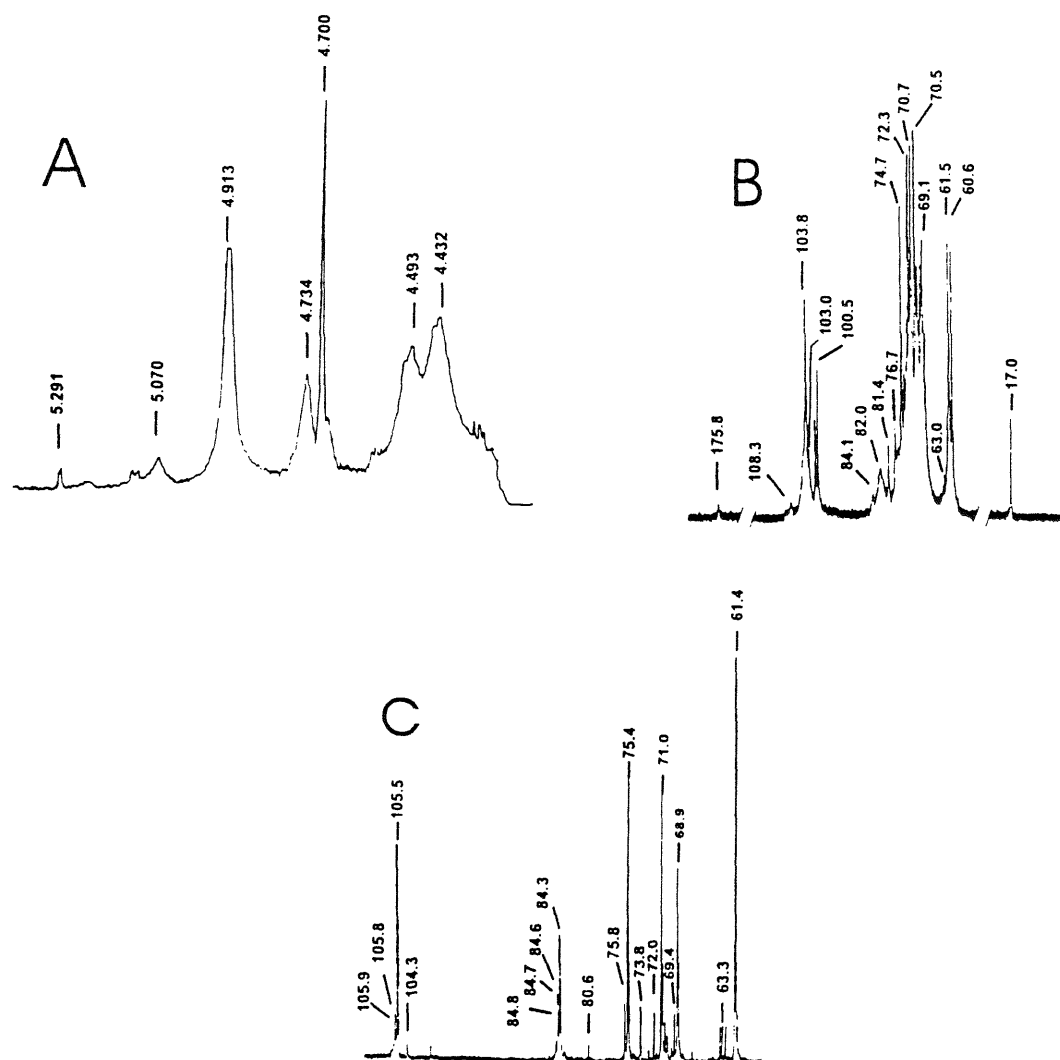


Fig. 1. Cashew polysaccharide: H-1 portion of its ^1H NMR (A) and ^{13}C NMR spectrum (B). ^{13}C NMR spectrum of polysaccharide submitted to one controlled Smith degradation (C).

lithium aluminum deuteride, and the product converted to partially *O*-methylated alditol acetates, non-reducing end- and 4-*O*-substituted-GlcpA units were found to be present.

A controlled Smith degradation of the polysaccharide resulted in removal of units of rhamnose and glucuronic acid, giving the ethanol-insoluble polysaccharide core with $[\alpha]_D + 43^\circ$, containing arabinose, xylose, mannose and galactose in a molar ratio of 8:1:1:90. The principal signals of its ^{13}C NMR spectrum [Fig. 1(C)] are typical of a (1 \rightarrow 3)-linked β -Galp polysaccharide [7], but with no α -Araf residues. Methylation data (Table 1) show non-reducing end units of Glcp (3%) and Galp (11%), with 3-*O*- (67%), 4-*O*- (2%), 6-*O*- (17%) and 3,6-di-*O*-substituted Galp units (14%). A second Smith degradation provided polysaccharide with $[\alpha]_D + 40^\circ$ and an arabinose to galactose ratio of 2:23, while a third one reduced the arabinose content to 3%. Their ^{13}C NMR spectra contained the same minor signals as that of the prod-

uct of the first Smith degradation, but in progressively diminishing amounts.

Little ethanol-soluble material (4% yield) was obtained on the first Smith degradation. It contained glycerol and components with R_{Gal} 1.20 and 0.31 and, although the latter was not completely identified, it gave rise to ^{13}C NMR signals at δ 100.5 > 103.3, showing the presence of unoxidized α - and β -pyranosyl units.

The native polysaccharide was partially hydrolysed at pH 1 for 5 hr at 100° , which removed Rha and most of the Ara units, to give a polymer with arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose and glucuronic acid in a 1:6:5:80:3:5 molar ratio, $[\alpha]_D + 20^\circ$, and a ^{13}C NMR spectrum with complex C-1 and *O*-substituted C-3 regions. Methylation analysis data on the per-*O*-methylated polysaccharide and its LiAlH_4 -reduced product (Table 1) showed non-reducing end units of Glcp (6%) and Galp (35%), and 3-*O*- (9%), 4-*O*- (9%), 6-*O*- (17%) and 3,6-di-*O*-substituted Galp

Table 1. Structures and percentage values of partially *O*-methylated alditol acetates formed from per-*O*-methylated polysaccharides from native cashew polysaccharide (NP), partially hydrolysed NP (PHP), Smith-Degraded NP (SDP) and LiAlH₄-reduced-NP and -PHP

<i>O</i> -Methylated alditol acetate	<i>R_f</i> (s) DB-210	% of <i>O</i> -methylated alditol acetate formed from methylated				
		NP	PHP	SDP	Reduced NP ⁺	Reduced PHP
2,3,5-Me ₃ -Ara	454	2	—	—	—	—
2,3,4-Me ₃ -Rha	461	2	—	—	—	—
2,3,4,6-Me ₄ -Glc*	518	10	6	3	7	5
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	532	19	35	11	17	26
2,4,6-Me ₃ -Gal	605	6	9	67	10	13
2,3,6-Me ₃ -Gal	645	10	5	2	6	5
2,3,4-Me ₃ -Glc	666	—	—	—	tr.	tr.
2,3,4-Me ₃ -Gal	707	19	17	3	26	22
2,3-Me ₂ -Glc	836	—	—	—	1	—
2,4-Me ₂ -Gal	864	32	28	14	33	29

* Confirmed by GC-MS on OV-225.

⁺ Reduced NP on OV-225 gave 2,3,4,6-Me₄-Glc (511 s; 4%), 2,3,4,6-Me₄-Gal (543 s; 8%), 2,4,6-Me₃-Gal (623 s; 7%), 2,3,6-Me₃-Gal (631 s; 2%), 2,3,4-Me₃-Glc (643 s; ~2%, dideuterated peak), 2,3,4-Me₃-Gal (696 s; 20%) and 2,4-Me₂-Gal (869 s; 23%). Standards tested on DB-210 were 2,3-Me₂-Glc (836 s) and 2,3,4-Me₃-Glc (658 s). Using DB-210, only 2,3-Me₂-Glc was found with red. NP; only 2,3,4-Me₃-Glc with red. PHP. With red. NP, a peak at 666 s did not correspond to 2,3,4-Me₃-Glc (maybe superimposition occurred). Standards tested with OV-225 were 2,3-Me₂-Glc (650 s) and 2,3,4-Me₃-Glc (829 s). GC-MS on OV-225 gave peaks less resolved than those on DB-210, but qualitatively reduced NP gave a shoulder at 642 s, corresponding to 2,3,4-Me₃-Glc, but nothing attributable to 2,3-Me₂-Glc. Red. PHP showed a shoulder peak at 648 s, corresponding to 2,3,4-Me₃-Glc.

units (28%). Glucuronic acid were present only as non-reducing end units, likely by removal of Rha_p and/or Ara_f units from O-4 on partial hydrolysis (a controlled Smith degradation of the polysaccharide provided a polymer with $[\alpha]_D^{25} + 34$).

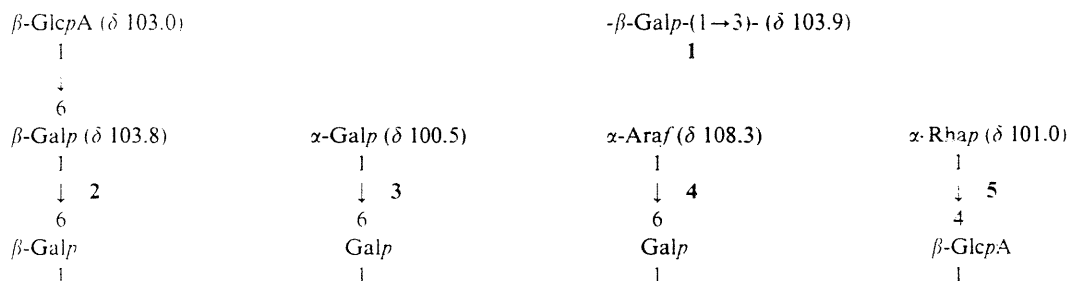
The latter possibility was eliminated following partial hydrolysis of the native polysaccharide with M acid at 100° for a short time. This cleaved some of the pyranosyl linkages, with the surprising maintenance of some furanosyl linkages, resulting in the formation of α -Ara_f-(1→6)- α -Gal. Other products were β -Gal_p-(1→3)- α -Gal, α -Gal_p-(1→6)- α -Gal, β -Gal_p-(1→6)- α -Gal, β -Glc_pA-(1→6)- α -Gal and β -Glc_pA-(1→6)- β -Gal_p-(1→6)- α -Gal, each oligosaccharide being characterized by its monosaccharide components and 1D and 2D NMR spectra.

The supernatant obtained during the ethanol precipitation of the native polysaccharide from an aqueous solution, contained a mixture of monosaccharides and oligosaccharides. The monosaccharide contents were quantified as follows: (1) with the intention of preventing their formation by any possible hydrolase activity, the gum was dissolved in water containing sodium borohydride in the presence of allitol as internal standard, and the resulting acetates analysed by GC-mass spectrometry; and (2) the gum together with allitol were first dissolved in water and then reduced with sodium borohydride, prior to conversion to alditol acetates. The oligosaccharides were isolated *via* successive charcoal and cellulose column chromatography of another ethanol supernatant, followed by preparative paper chromatography and were char-

acterized by their monosaccharide compositions and 1D ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, the latter including a DEPT program. The utilized 2D programs were COSY and HMQC.

The structure of the native Brazilian polysaccharide is highly branched consisting of a (1→3)-linked β -D-Gal_p main chain (1), substituted at O-6 by various side-chains. Characterized components were: β -D-Glc_pA-(1→6)- β -D-Gal_p-(1→6)- β -D-Gal_p (2), α -D-Gal_p-(1→6)-D-Gal_p (3) and α -L-Ara_f-(1→6)-D-Gal_p (4). α -L-Rha_p-(1→4)- β -D-Glc_pA- groups (5), linked (1→6) to D-Gal_p, are likely to be present. The arabinose-containing side-chains are long, since even three controlled Smith degradations were insufficient to remove them all (these were not α -Ara_f structures). Based on the ¹³C NMR data for the oligosaccharides liberated on acid hydrolysis, the partial C-1 NMR spectrum of the native polysaccharide [in Fig. 1(B)] can be assigned as indicated in structures 1–5 (δ values for D₂O solutions).

Compared with the polysaccharide of gum collected in India, there are similar structures, especially a main chain of (1→3)-linked β -D-Gal_p units, some of which were substituted at O-6 by side-chains. These were concluded to be long, containing (1→3)- and (1→6)-linked β -D-Gal_p units, those of (1→2)-linked Ara_f up to 5 units long, needing five controlled Smith degradations for their complete removal, and end units of Ara_p, Ara_f, Glc_p, Rha_p, Man_p, Xyl_p and β -D-Glc_pA-(1→6)-D-Gal_p [6]. We now report the absence of 4-Me-Glc_pA units in the Brazilian polysaccharide. The other differences could be quantitative and seem to



be due to the current availability of more modern techniques, especially those of methylation analysis and NMR spectroscopy. Examples are the characterization of Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -Glc pA -(1 \rightarrow 6)- β -Gal p and α -Ara f -(1 \rightarrow 6)-Gal- non-reducing end-structures.

The gum contained free rhamnose (0.005%), arabinose (0.03%), mannose (0.007%), galactose (0.03%) and glucose (0.02%), and the isolated oligosaccharides were characterized as β -Gal p -(1 \rightarrow 6)- α β -Gal (0.05%), α -Rhap-(1 \rightarrow 4)- α β -Glc A (0.008%) and α -Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -Glc pA -(1 \rightarrow 6)- β -Gal p -(1 \rightarrow 6)- α β -Gal (0.008%). They were not formed by *in situ* acid hydrolysis of the weakly acidic gum because of the resistance of the pyranosyl glycosidic linkages at ambient temperatures. Other more likely possibilities, because of their structural similarity to the side-chains of the polysaccharide, are that they are formed as by-products from biosynthetic intermediates or by the action of *exo*-hydrolases.

EXPERIMENTAL

Preparation of cashew-nut tree polysaccharide. This was pptd from an aq. soln (250 g in 1250 ml) with EtOH (3 l), the polysaccharide was redissolved in H₂O and then freeze-dried to remove residual EtOH.

Specific rotations. These were determined at 25 ° in H₂O at 0.3–0.6%, except for controlled Smith degradation products, whose solvent was H₂O containing 3% NaOH.

Determination of M_n of polysaccharide. This was carried out using a light-scattering apparatus with a 0.1% aq. soln of polysaccharide with GPC columns in series of OH pak B-804 and OH pak B-805 (Shodex), eluted at 1 ml min⁻¹ with 0.1 M NaNO₃–0.02% NaN₃ (λ 633 nm).

Monosaccharide composition. Polysaccharides and oligosaccharides were hydrolysed with 1 M H₂SO₄ for 18 hr at 100 °. After neutralisation (BaCO₃), part of the solns were evapd and examined by PC (solvent: *n*-BuOH–pyridine–H₂O, 5:3:3; spray *p*-anisidine HCl). The other part was reduced with NaBH₄, acetylated with Me₂CO–pyridine at 100 ° and the products examined by GC-MS using an OV-225 capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d.), held at 50 ° during injection, then programmed at 40 ° min⁻¹ to 220 ° (isothermal). Glucitol hexa-acetate gave peaks in the order m/z 140 > 139 > 141, showing that some of it arose from

glucose, as well as glucuronolactone. The polysaccharide was hydrolysed with 2 M TFA for 8 hr at 100 ° to give a residue which gave crystalline α -galactose [from MeOH–EtOH (1:1)], $[\alpha]_D^{25} + 134$ (initial value, 80 s) \rightarrow +79° (*c.* 0.5 H₂O; constant value). The ¹³C NMR spectrum of resulting α β -galactose [8] and its $[\alpha]_D^{25}$ [9] indicated the D-enantiomer. Recovered from the mother liquor *via* cellulose CC (eluant: Me₂CO, then Me₂CO–H₂O, 10:1) were L-arabinose, L-rhamnose and D-glucuronolactone (R_{Rham} 1.04), which were identified by their ¹³C NMR spectra and whose enantiomeric forms were determined by conversion to the acetates of their (–)-2-octyl glycosides and examination by GC-MS using a Durowax-4 capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d.) programmed from 50 (40 ° min⁻¹) \rightarrow 230° (isothermal) [10].

Uronic acid contents. These were determined by the *m*-hydroxy-biphenyl method [11].

Methylation analysis of polysaccharides. Polysaccharides (\approx 50 mg) were methylated by the method of ref. [12], which was necessary in order to render the products soluble in the reaction medium of Kerec and Ciacunu [13]. Methylation was completed using the procedure of ref. [14]. The *O*-methylated products were refluxed with 3% MeOH–HCl for 3 hr and then hydrolysed with 1 M H₂SO₄ at 100 ° for 18 hr. After NaBH₄ reduction and acetylation, the resulting mixts were examined by GC-MS on OV-225 and DB-210, using the conditions described above. Two columns were necessary to resolve the possible isomers of Rha, Ara and Gal. On OV-225, there is superimposition of 2,3,5-Me₃-Ara (447 s) and 2,3,4-Me₃-Rha (448 s). Also of 2,4-Me₂-Ara (545 s), 3,4-Me₂-Ara (542 s), and 2,3,4,6-Me₄-Gal (542 s). Resolved are 2,5-Me₂-Ara (509 s), 3,5-Me₂-Ara (499 s), and 2,3-Me₂-Ara (557 s). On DB-210, 2,5-Me₂-Ara (533 s) and 2,3,4,6-Me₄-Gal (533 s) are superimposed. Resolved are 3,5-Me₂-Ara (519 s), 2,3-Me₂-Ara (577 s), 3,4-Me₂-Ara (571 s), 2,4-Me₂-Ara (558 s), 2,3,4,6-Me₄-Gal (533 s), 2,3,5-Me₃-Ara (462 s), and 2,3,4-Me₃-Rha (469 s).

NMR. ¹H soln spectra were obtained at 400 MHz at 70 ° in D₂O using presatn of the DOH resonance. For ¹³C spectra, the solvent was D₂O at 30 °, except in the case of Smith-degraded polysaccharides, when the solvent was 5% NaOD in D₂O. Small OCH₃ signals were not detected in the ¹H (δ \sim 3.2) and ¹³C spectra [δ \sim 59; Fig. 1(B)]. Chemical shifts are expressed in δ , based on a standard of TMS. The ¹³C NMR spectrum

of the polysaccharide in D₂O contained signals that were assigned on the basis of those of oligosaccharides, obtained *via* partial hydrolysis and described below. C-1 signals were at δ 175.8 (very small; CO₂H), 108.3 (α -Araf-(1 \rightarrow 6)-Galp, very small), the largest one at δ 103.8 (β -Galp-(1 \rightarrow 6)-Galp) > 100.5 (α -Galp-(1 \rightarrow 6)-Galp) > 101.0 (α -Rhap) > 103.0 (β -GlcApA-(1 \rightarrow 6)-Galp) = 103.9 (β -Galp-(1 \rightarrow 3)-Galp). There was a very small signal at δ 84.1 (C-4, α -Araf) and a larger broader complex of three signals from δ 81.4 to 82.0 (3-*O*-substituted β -Galp's), 17.0 (C-6, Rha). Negative ¹³C DEPT signals of C-6 of Galp units were not detectable because of superimposition on positive ones with the same shift. The ¹H NMR spectrum contained broad H-1 signals at δ 4.432, 4.493, 4.700, 4.734, 4.913, 5.070 and 5.291.

Successive controlled Smith degradations. To cashew polysaccharide (6.50 g) dissolved in H₂O (200 ml), was added NaIO₄ (20 g), and after 2 days it was followed by ethylene glycol (5 ml) and the solution then dialysed. NaBH₄ (2 g) was added and after 3 hr the soln was acidified with HOAc and dialysed, first against tap (20 hr) and then distilled H₂O (20 hr). The resulting polyalcohol contained glycerol, arabinose and galactose in a 75:3:22 molar ratio. The soln was evapd to 100 ml, adjusted to pH 2.0 with aq. H₂SO₄, heated at 100° for 1 hr, neutralized with BaCO₃, and then filtered. The filtrate was evapd to 20 ml and added to EtOH (200 ml), giving a pp., which was isolated (Ara, Xyl, Man, Gal; 8:1:1:90 molar ratio), yield 1.76 g. It was only sparingly soluble in cold H₂O. Its ¹³C NMR spectrum in D₂O-5% NaOH contained [Fig. 1(C)] predominant signals at δ 61.4 (C-6; inverted in DEPT spectrum), 68.9 (C-4), 71.0 (C-2), 75.4 (C-5), 84.3 (C-3) and 105.55 (C-1), corresponding to a 1 \rightarrow 3-linked β -galactopyranan. Respective values obtained for internal units of β -Galp-[(1 \rightarrow 3)- β -Galp]_{*n*}-1 \rightarrow 4)- α -Glc in D₂O were 61.7, 69.4, 71.1, 75.9, 82.8 and 104.8 [7]. The mother liquor contained, following chromatography on a cellulose column (Me₂CO-H₂O, 0:1 then 3:1), material (260 mg) which gave rise to PC spots with *R_f* 0.31 and 1.20, as well as one of glycerol.

The polysaccharide (1.56 g) mostly dissolved in H₂O (100 ml) at 100° after 1 hr and, on addition of NaIO₄ (3 g), the remaining insol. material dissolved. This was converted to the polyalcohol, which contained glycerol, arabinose and galactose in a 69:4:27 ratio. The controlled Smith degradation procedure was repeated. Obtained were polysaccharide, pptd with Me₂CO-EtOH (1:1) (0.74 g) containing Ara (*R_f* 657) and Gal in a 2:23 molar ratio and soluble material (0.21 g). The ¹³C NMR spectrum of the polysaccharide in 5% NaOH in D₂O also corresponding to a 1 \rightarrow 3-linked β -galactopyranan.

A portion (0.5 g) of the polysaccharide was submitted to a further controlled Smith degradation, first giving the polyalcohol which contained glycerol, arabinose and galactose in a 2:1:4 ratio. The resulting polysaccharide (224 mg) contained Ara and Gal

in a 3:97 ratio and gave a ¹³C NMR spectrum similar to those obtained from polysaccharide after one and two degradations, with the six main signals described above, but minor ones at δ 101.3, 104.3, 105.8 and 105.9 (C-1's) and 3-*O*-substituted β -C-3's at δ 84.6, and 84.7, and another at δ 80.6, possibly from *O*-substituted α -C-3 or C-4. EtOH-sol. material was also formed (240 mg).

Mild partial hydrolysis. Polysaccharide (5.34 g) was dissolved in H₂O (200 ml), which was adjusted to pH 1 with dilute aq. H₂SO₄ and kept at 100° for 5 hr. The soln was neutralized with BaCO₃, filtered, the filtrate treated with cation-exchange resin, filtered, evapd to a small vol. and the polysaccharide pptd with excess EtOH; yield 2.35 g. It contained Ara, Xyl, Man, Gal and Glc in a 1:6:5:85:3 molar ratio. The ¹³C NMR spectrum contained very broad signals in the C-1 β (δ 103.7 > 104.5 > 103.9 > 104.0 > 104.2 > 103.1) and 3-*O*-substituted regions (broad and continuous from δ 81.25 to 82.8). There were DEPT inverted signals at δ 61.46 (large) and δ 60.54 (small) and, possibly, obscured ones at δ 69.5 and 69.9. Smaller C-1 signals were present at δ 92.7, 96.6, 96.9 and 100.4.

Controlled Smith degradation of partially hydrolysed polysaccharide. Degraded polysaccharide (0.6 g) was successively oxidized with NaIO₄ (3 g) in H₂O (50 ml) for 24 hr and reduced with NaBH₄, as described above, to give a polyalcohol which contained glycerol, threitol, arabinitol and galactose in a 76:2:1:21 molar ratio. The polyalcohol was partially hydrolysed at pH 2 (adjusted with H₂SO₄) for 1 hr at 100°, giving rise to EtOH-insol. material (0.18 g).

Stronger partial hydrolysis of polysaccharide: characterisation of resulting oligosaccharides. Polysaccharide (4.12 g) in H₂O (150 ml) containing MTFA (12.5 ml) was kept at 100° for 1 hr. The product was fractionated on a column of charcoal-diatomaceous earth (40 g; 1:1); first with H₂O (3 l) and then with 30% aq. EtOH (2 l), the latter giving a residue of 0.53 g. This gave on PC (*n*-BuOH-pyridine-H₂O, 1:1:1), apart from galactose (*R_{Lact}* 1.59), spots with *R_{Lact}* 0.32 > 0.86 > 1.15, along with smaller quantities of those with *R_{Lact}* 0.14, 1.00, 1.15, 1.30 and 1.44. The mixt. was fractionated on Whatman No. 3 filter paper and each component isolated. Some of the fractions were pure as determined by ¹³C NMR and monosaccharide composition. In the case of frs containing glucuronic acid, traces of glucitol hexa-acetate, labelled with ²H₂ at C-6, were formed. Structures of pure frs were determined, principally by ¹³C NMR spectroscopy, including ¹³C DEPT, which served for the identification of 6-*O*-substituted Galp signals, which were inverted in the δ 67–70 region. *R_{Lact}* 0.14: 29 mg, giving Ara, Gal and Glc (2:95:3). It had the ¹³C NMR spectrum of *O*- β -D-GlcApA-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Gal with signals at δ 103.1 (C-1'), 103.7 and 103.6 (C-1', α - and β -isomer, resp.), 96.9 (C-1 β), 92.8 (C-1 α), and 176.2 (CO₂H). No unsubstituted C-6 signals of Gal or those of *O*-substituted C-2, C-3, or C-4 were detected and with DEPT, inverted signals

appeared at δ 70.0, 69.83, and 69.76 (*O*-substituted C-6's). The H-1 region of the ^1H NMR spectrum contained consistent signals at δ 4.43, $J = 7.7$ Hz (H-1', α -anomer), 4.44, $J = 7.9$ Hz (H-1', β -anomer), 4.50, $J = 7.7$ Hz (H-1''), 4.58, $J = 7.8$ Hz (H-1 β) and 5.25, $J = 3.7$ Hz (H-1 α). R_{Lact} 0.32 \cdot 139 mg, giving Gal and Glc (79:21). It had the ^{13}C NMR spectrum of 6-*O*- β -D-GlcpA- α - β -D-Gal with signals at δ 175.6, 103.0, 96.85 > 92.8, no *O*-substituted at δ > 76.2, inverted with DEPT at δ 69.70 > 69.77. The H-1 region of the ^1H NMR spectrum contained consistent signals at δ 4.48, $J = 7.9$ Hz (H-1', α -anomer), 4.49, $J = 8.1$ Hz (H-1', β -anomer), 4.55, $J = 7.0$ Hz (H-1 β) and 5.23, $J = 3.7$ Hz (H-1 α). R_{Lact} 0.86 \cdot 47 mg, giving Gal. Its ^{13}C NMR signals of C-1 were at δ 103.6 > 103.7, 99.0, 96.88 > 96.92 and 92.8 (smaller than β 's). No *O*-substituted signals at δ > 74.27. DEPT inverted signals at 61.4 > 61.6, 67.1 > 67.3 and 69.9. Since the β -C-1 signal is split, it was a disaccharide from its R_{Lact} and a mixture of 6-*O*- α - and 6-*O*- β -D-Galp- α - β -D-Gal. The presence of this mixt. was consistent with the ^1H NMR spectrum, which contained H-1 signals of 6-*O*- β -D-Galp- α - β -D-Gal at δ 4.430, $J = 7.7$ Hz (H-1', α -anomer); δ 4.44, $J = 8.1$ Hz (H-1', β -anomer); 4.58, $J = 8.0$ Hz (H-1 β) and 5.24, $J = 4.0$ Hz (H-1 α) and those of 6-*O*- α -D-Galp- α - β -D-Gal at δ 4.96, $J = 3.5$ Hz (H-1'); 4.57, $J = 7.9$ Hz (H-1 β) and 5.25, $J = 4.0$ Hz (H-1 α). The assignments of the H-1 α signals of each disaccharide are interchangeable. R_{Lact} 1.0 \cdot 7 mg, giving Ara, Man, Gal and Glc (7:5:82:6). The ^{13}C NMR spectrum showed a mixt. with 14 signals in the C-1 region and the fr. was not further examined. R_{Lact} 1.15 \cdot 20 mg, giving Ara and Gal (1:24). Its ^{13}C NMR corresponded to 3-*O*- β -D-Galp- α - β -D-Gal with signals of the β -isomer at δ 104.76 (C-1'), 96.6 (C-1) and 79.8 (*O*-substituted C-3) and smaller ones of the α -isomer at δ 104.81 (C-1'), 92.6 (C-1) and 82.9 (*O*-substituted C-3). According to a DEPT determination, there were signals of *O*-substituted C-6 β (large) at δ 61.39 and *O*-substituted C-6 α (small) at δ 61.57. The H-1 portion of its ^1H NMR spectrum, in accord, contained signals at δ 4.59, $J = 7.5$ Hz (H-1', α -anomer), 4.60, $J = 7.5$ Hz (H-1 β), 4.62, $J = 7.1$ Hz (H-1', β -anomer) and 5.27, $J = 2.7$ Hz (H-1 α). R_{Lact} 1.30 \cdot 17 mg, pure, giving Ara and Gal (46:54). It gave rise to ^{13}C signals of α -Araf at δ 63.13 (C-5' β) > 63.17 (C-5' α), inverted with DEPT; 77.15 (C-3'), 81.45 (C-2'), 83.3 (C-4') and 108.2 (C-1') [13]. Those of Gal were at δ 67.25 (C-6 β) > 67.8 (C-6 α), both inverted with DEPT, 92.8 (C-1 α ; smaller) and 96.9 (C-1 β). Its ^1H NMR spectrum contained signals of H-1' of α -Araf at δ 4.98 ($J = 2.0$ Hz) and H-1 α (δ 4.55, $J = 8.0$ Hz), and H-1 β (δ 5.24, $J = 2.8$ Hz) of Galp. The disaccharide had $[x]_D + 5$, indicating an α -L-configuration. It thus corresponds to 6-*O*- α -L-Araf- α - β -D-Gal and this was confirmed as follows. The HMQC spectrum defined the signals of H-6 β (δ 3.74) and H-6 α (δ 3.84) by correlation with the C-6 signals and these values were used to define the H-6 signals in a ROESY spectrum, in which they were correlated with H-1' of α -Araf at δ 4.98. Correlations were not

found in the HMBC spectrum. R_{Lact} 1.44 \cdot 8 mg, giving Ara, Man and Gal (7:16:70). It was impure as the C-1 region of its ^{13}C NMR spectrum contained 12 signals: it was not further investigated.

Estimation of monosaccharides in gum samples. Gum (504 mg) and allitol (5 mg) in H_2O (20 ml) were stirred in the presence of NaBH_4 (50 mg). Bubbles on the surface of the gum showed that it was reacting with the reducing agent. It dissolved after 16 hr. but a little more reductant (20 mg) was added and after 5 hr. the soln was adjusted to pH 7 with HOAc. It was then freeze-dried, dissolved in H_2O (5 ml) and added to EtOH (15 ml). The resulting ppt. was removed by filtration and the filtrate evapd to a residue, which was dissolved in MeOH. This was evapd and the process repeated $\times 2$. Acetylation was carried out with Ac_2O -pyridine (2 ml, 1:1) at 100° for 1 hr. the mixt. treated with ice-water for 1 hr and then extracted with CHCl_3 , which was then evapd. The residue was analysed by GC-MS. In another expt, gum (500 mg) and allitol (5.0 mg) were dissolved in H_2O prior to addition of NaBH_4 (50 mg). After 16 hr. the time it took to dissolve the gum, the reductant was added and, after 3 hr. the mixt. was converted to alditol acetates, as described above, which were then analysed by GC-MS.

Isolation and characterisation of free reducing oligosaccharides. The gum (250 g) was dissolved in H_2O (1.25 l) and the soln added to EtOH (3 l). The resulting ppt. was isolated by filtration (yield 80%) and the filtrate evapd to dryness. It was dissolved in H_2O and applied to a column of activated charcoal-diatomaceous earth (\cong Celite, 40 g, 1:1), which was eluted with H_2O (4 l), followed by 30% (2 l) and 50% aq. EtOH, followed by evapn. Eluted material was fractionated on Whatman No. 3 filter paper (*m*-BuOH-pyridine- H_2O , 1:1:1). EtOH eluates were each fractionated on a cellulose column, using as eluants mixts of Me_2CO - H_2O of 7:1 (1 l), 4:1 (1 l), 3:1 (2 l) and 5:2 (2 l), followed by further fractionation by FC as before. Further purification was carried out giving fractions with R_f s on cellulose TLC (same solvent) of 0.44, 0.58, 0.67 and 0.92. These were characterised as follows: as bases for ^{13}C assignments for these oligosaccharides, δ values for Me α -Rhap, Me α - and β -Glc pA and Me α - and β -Galp [8] were used, but with a correction of -0.7 ppm. R_f 0.92. This gave a ^{13}C NMR spectrum identical with that of β -Galp- (1 \rightarrow 6)- α - β -Gal [3] with δ 103.43 (C-1' β) > 103.49 (C-1 α), 96.7 (C-1 β) > 92.6 (C-1 α), 75.5 (C-5'), 74.1 (C-5'), 72.9 (C-3 β and C-3' β), 69.4 (C-6 β) > 69.6 (C-6 α) and 61.3 (C-6). R_f 0.67. Based on the ^{13}C spectra of Me α -Rhap and Me α - and β -Glc pA, and COSY and HMQC examination, it corresponds to α -Rhap- (1 \rightarrow 4)- α - β -GlcA with δ 101.2 (C-1'), 96.4 (C-1 β) > 92.4 (C-1 α), 80.1 (C-4 α) < 79.7 (C-4 β), 77.0 (C-3 β), 74.5- and 74.81 (C-3 and C-5 β), 72.45, 72.1, 70.6, 69.4 (C-5', 17.0 (C-6') and 175.7 (C-6). R_f 0.44. For the characterisation of this fr., it was necessary to use as standard, α -Rhap- (1 \rightarrow 4)- β -Glc pA- (1 \rightarrow 6)- α - β -Gal of Angico

gum [3], which was characterized using its $^1\text{D}^1\text{H}$ and ^{13}C (with DEPT) spectra, with COSY and HMQC determinations to make the assignments: δ 102.9 (C-1'), 101.2 (C-1''), 96.9 (C-1 β) > 92.9 (C-1 α), 79.7 (C-4'), 76.73 (C-5'), 74.78 (C-3'), 74.3 (C-5 β), 73.7 (C-2'), 73.15 (C-3 β), 72.46 (C-3'), 72.35 (C-2 β), [69.7 (C-6 α), 59.6 (C-6 β): weak DEPT because of overlap], 17.0 (C-6') and 175.6 (C-6''). This fr. corresponds to α -Rhap-(\rightarrow 4)- β -Glc pA-(1 \rightarrow 6)- β -Galp-(1 \rightarrow 6)- α β -Gal. with signals at δ 103.73 (C-1' α) < 103.66 (C-1' β), 103.1 (C-1'), 96.9 (C-1 β) > 92.9 (C-1 α), 79.6 (C-4'), 76.8 (C-5), 74.8 (C-3''), 74.33 (C-5'), 74.27 (C-5 β), 17.0 (C-6'), 175.7 (C-6''). R_f 0.58. This fraction was a mixt. and not characterised.

Acknowledgements—The authors would like to thank E Marguerite Rinaudo, Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales, Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France for M_r determinations.

REFERENCES

- Delgobo, C. L., Gorin, P. A. J. and Iacomini, M., *XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, May 1–4, L 37, 1993, p. 113.
- Delgobo, C. L., Gorin, P. A. J., Torri, G. and Iacomini, M., *XXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, May 14–17, L 27, 1994, p. 123.
- Delgobo, C. L., Gorin, P. A. J. and Iacomini, M., *Phytochemistry* (in press).
- Menestrina, J. M., Delgobo, C. L., Iacomini, M., Jones, C. and Gorin, P. A. J., *XXV Annual Meeting of The Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, May 4–7, L-55, 1996, p. 116.
- Anderson, D. M. W., Bell, P. C. and Millar, J. R. A., *Phytochemistry*, 1974, **13**, 2189.
- Anderson, D. M. W. and Bell, P. C., *Analytica Chimica Acta*, 1975, **79**, 185.
- Collins, J. G., Bradbury, H., Trofinoff, E. and Messer, M., *Carbohydrate Research*, 1981, **92**, 136.
- Gorin, P. A. J. and Mazurek, M., *Canadian Journal of Chemistry*, 1975, **53**, 1212.
- Pigman, W. and Isbell, H. S., *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 1968, **23**, 11.
- Gorin, P. A. J., Iacomini, M., Feijó, M. A. L., Zanin, S. M. W. and Hogge, L., *Arquivos Biologia Tecnologia (Paraná)*, 1985, **28**, 387.
- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G., *Analytical Biochemistry*, 1973, **54**, 484.
- Haworth, W. N., *Journal of the Chemical Society*, 1915, 8.
- Ciacunu, I. and Kerek, F., *Carbohydrate Research*, 1984, **131**, 209.
- Kuhn, R., Trischmann, M. and Löw, I., *Angewandte Chemie*, 1955, **67**, 32.

ERRATA

página	parágrafo (P) nº de linhas (L)	onde lê-se	lê-se
viii	1º P; 2ª L	Sívia	Sílvia
33	1º P; 4ª L	contém	contêm
33	2º P; 1ª L	Em muitos casos	Em todos os casos
36	3ª L	O citoplasma	Os citoplasmas
38	2º P; 1ª L	a qual	as quais
38	2º P; 7ª L	monossacarídeo	monossacarídeos
38	2º P; 8ª L	proteíca	proteica
39	7ª L	β-galactapiranose	β-galactopiranose
39	2º P; 3ª L	proteíco	proteico
40	4ª L	as	às
64	item 3.11.4 2ª L	kit da marca Sigma	kit (Signal labelling kit)
82	espectro	69,79	69,78
88	4º P; 3ª L	68,78	69,78
90	2ª L	íon	pseudo-íon
90	4ª L	pico	pico de fragmentação
96	5º P; 3ª L	α-D-Rhap	α-L-Rhap
102	3ª L	íon	pseudo-íon
102	4ª L	ácido urônico	ácido glucurônico
102	4ª L	hexose	ramnose (metilpentose)
105	2º P; 3ª L	102,8	103,0
109	6ª L	íon	pseudo-íon
109	10ª L	íon	pseudo-íon
112	3º P; 5ª L	α-lucose	α-glucose
113	espectro	101,2	101,1
119	2ª L	íon	pseudo-íon
119	penúltima linha	663,4	663,2
128	8ª L	precipitação	precipitação
140	12ª L	acetatos de alditóis	derivados trimetilsilil éteres
141	2º P; 3ª L	C-4	Carbono do grupo metil
149	2º P; 13ª L	6-O-	6-O-
149	2º P; última L	galactose (e glucose) e arabinose.	β e α-galactose, respectivamente.
159	4ª L	¹³ C-RMN	RMN- ¹³ C
162	4ª L	, 1981	(1981)
162	7ª L	ara	para
167	2º P; 5ª L	degradação	degradação
191	3ª estrutura	4,44 (H-1)	4,96 (H-1)
		103,6 (C-1)	99,0 (C-1)
191	4ª estrutura	96,88 (C-1)	99,0 (C-1)
220	6ª ref.	-C.	C.
226	4ª ref.	1993	1983
234	6ª ref.	Mimosa scrabella	Mimosa scrabella
236	2ª ref.	SLNEKER	SLONEKER