

MARIA RITA SIERAKOWSKI

ASPECTOS ESTRUTURAIS DA MUCILAGEM DE  
*Pereskia aculeata*, Mill (ora-pro-nobis)

Tese apresentada ao Departamento de  
Bioquímica da Universidade Federal do Pa-  
raná, visando a obtenção do Grau de Dou-  
tor em Ciências.

CURITIBA

1988



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curso de Pós-Graduação em Bioquímica

**TÉRMO DE APROVAÇÃO**


**TÍTULO:** "ASPECTOS ESTRUTURAIS DA MUCILAGEM DE Pereskia aculeata,  
mill (ora-pro-nobis)

**MARIA RITA SIERAKOWSKI**


Tese aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em ciências, no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

  
Dr. João Batista Chaves Corrêa

  
Dr. José Domingos Fontana

  
Dr. Alberto Saul Cerezo

  
Dr. Carl P. von Dietrich

  
Dra. Eliane Barreto Berger

Curitiba, 13 de abril de 1988.

*Tese orientada pelos Professores*

*Dr. JOÃO BATISTA CHAVES CORRÊA*

*Dr. PHILIP ALBERT JAMES GORIN*

## ÍNDICE

Agradecimentos .....	v
Lista de Figuras .....	vii
Lista de Tabelas .....	x
Lista de Abreviaturas .....	xii
Resumo .....	xv
Summary .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Funções e usos industriais dos polissacarídeos .....	3
1.2 Polissacarídeos contendo unidades de ácido galacturônico: pectinas, gomas e mucilagens .....	6
1.3 Polissacarídeos contendo unidades de ácidos urônicos altamente <u>O</u> -substituídas .....	9
1.4 Arabinogalactanas .....	11
1.5 Processos degradativos dos polissacarídeos: $\beta$ -eliminação .....	19
1.6 A <i>Pereskia aculeata</i> (ora-pro-nobis) .....	24
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>

3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
3.1 Materiais e Métodos Gerais .....	29
3.1.1 Hidrólises .....	34
3.1.1.1 Hidrólises alcalinas para a liberação dos substituintes acetil e metoxil .....	34
3.1.1.2 Hidrólises ácidas .....	34
3.1.2 Redução e acetilação dos monossacarídeos obtidos nas hidrólises ácidas totais das a- mostras .....	35
3.1.3 Obtenção do Polissacarídeo P .....	36
3.1.3.1 Preparo do pó acetônico .....	36
3.1.3.2 Extração do polissacarídeo com água ...	36
3.1.3.3 Desproteínização segundo SEVAG .....	37
3.2 Materiais e Métodos Especiais .....	38
3.2.1 Filtrações em Géis .....	38
3.2.1.1 Filtração em Gel de Sephadex G 200 ....	38
3.2.1.2 Filtração em Gel de Sepharose 6B .....	38
3.2.1.3 Filtração em Bio-Gel A5 M .....	38
3.2.2 Fracionamento do polissacarídeo P em colu na de DEAE-celulose, forma Cl <sup>-</sup> .....	39
3.2.3 Análises de Metilação .....	40
3.2.3.1 Análise de metilação das frações F-2 e F-3 .....	40
Método de HAWORTH .....	40
Método de KUHN et alii .....	40
3.2.3.2 Análise de metilação do polissacarídeo P	41
3.2.3.3 Carboxi-redução do polissacarídeo P me- tilado .....	42
3.2.3.4 Análise dos produtos de hidrólise ácida a) das frações F-2 e F-3 metiladas:	

b) do polissacarídeo: 1. Metilado (P); 2. Metilado e carboxi-reduzido (P <sup>0</sup> ); 3. Metilado, carboxi-reduzido e permetila do (P <sup>®</sup> ) .....	42-43
3.2.4 Hidrólise ácida parcial do polissacarí- deo P, obtenção de P-1 .....	43
3.2.5 Tratamento do polissacarídeo P-1 com ga- lactose oxidase .....	44
3.2.6 Obtenção e análise dos oligossacarídeos (FA) .....	45
3.2.7 Análise por espectroscopia de ressonân- cia nuclear magnética .....	46
3.2.8 Análise da ligação açúcar-proteína no po- lissacarídeo P .....	46
3.2.9 Processo de β-eliminação do polissacarí- deo P, com lítio em etilenodiamina .....	47
3.3 Análise da distribuição dos grupos <u>O</u> -acetí- licos no polissacarídeo P .....	48
3.3.1 Localização dos grupos <u>O</u> -acetílicos pelo método de BOUVENG modificado por CORRÊA et alii .....	49
3.3.2 Localização dos grupos <u>O</u> -acetílicos usan- do-se DMSO como solvente, metóxido de sô- dio metanólico como agente desacetilante e CD <sub>3</sub> -I como substituinte de grupos <u>O</u> -acetí- licos .....	50
3.4 Viscosidade do Polissacarídeo P .....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
4.1 Obtenção do polissacarídeo P .....	54
4.2 Composição química do polissacarídeo P ..	56

4.3 Estudo da homo ou heterogeneidade do polissacarídeo P .....	57
4.4 Composição química das frações F-2, F-3 e F-7 .....	60
4.5 Composição de P-1 em monossacarídeos ....	62
4.6 Análise estrutural do polissacarídeo P e de seus componentes .....	62
4.7 Localização dos grupos <u>O</u> -acetílicos no polissacarídeo P .....	90
4.8 Análise da viscosidade .....	104
5. CONCLUSÕES .....	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115

## AGRADECIMENTOS

Aos professores **Dr. João Batista Chaves Corrêa** e **Dr. Philip Albert James Gorin**, orientadores, pelo incentivo, atenção e aprendizado;

À professora **Dra. Fany Reicher**, amiga de sempre, pelas sugestões e correções efetuadas;

Aos **meus pais** pelo incentivo ao conhecimento, em todas e quaisquer circunstâncias;

Ao arquiteto **Alfonso Jiquez-Oie** pelo carinho, e pela paciência na confecção dos desenhos apresentados neste trabalho;

Aos Drs. **M. Mazurek** e **L. Hogge** of Plant Biotechnology Institute, N.R.C., Saskatoon, Canadá pelos espectros de g.l.c-m.s, de  $^1\text{H}$ -n.m.r e de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r;

Aos professores **Dra. Glaci T. Zancan**, **Dr. José Domingos Fontana** e **Dr. Sieg Odebrecht** pelo apoio em momentos necessários;

À Doutoranda **Márcia Helena Mendonça** pela atenção e análise com a galactose-oxidase;

Ao Professor **Dr. Marcello Iacomini**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pela colaboração;

Aos professores **Dr. Marco Aurélio Lacombe Feijó** e **Dr. José Domingos Fontana** pela revisão e sugestões apresentadas;



À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela atenção e colaboração prestadas;

À Nilce do Rocio Chiquito e Tereza Nanci Loppnow pelos serviços de datilografia;

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários dos Departamentos de Química e de Bioquímica da U.F.Pr. pela colaboração e amizade.

Ao CNPq e a FINEP pelo suporte financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	1	Filtração em Bio-Gel A5 M do polissacarídeo P .....	58
	2	Filtração em Gel Sepharose 6B do polissacarídeo P .....	59
	3	Proporção dos componentes das três principais frações obtidas a partir do polissacarídeo P, após cromatografia em DEAE-celulose, forma Cl <sup>-</sup> .....	61
	4A	Espectro de <sup>1</sup> H-n.m.r da fração F-2, em óxido de deutério (D <sub>2</sub> O). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m .....	65
	4B	Espectro de <sup>1</sup> H-n.m.r da fração F-3, em óxido de deutério (D <sub>2</sub> O). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m .....	66
	4C	Espectro de <sup>1</sup> H-n.m.r da fração F-7, em óxido de deutério (D <sub>2</sub> O). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m .....	67
	5	Espectro de <sup>1</sup> H-n.m.r do polissacarídeo P de <i>Pereskia aculeata</i> , em óxido de deutério (D <sub>2</sub> O). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m .....	68
	6A	Espectro de <sup>13</sup> C-n.m.r da fração F-2, em óxido de deutério (D <sub>2</sub> O), a 70 <sup>o</sup> . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m .....	70
	6B	Espectro de <sup>13</sup> C-n.m.r da fração F-3, em óxido de deutério (D <sub>2</sub> O), a 70 <sup>o</sup> . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m .....	70

	mentos químicos são expressos em $\delta$ p.p.m	71
6C	Espectro de $^{13}\text{C}$ -n.m.r da fração F-7, em $\bar{\text{o}}\text{xido}$ de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em $\delta$ p.p.m	72
7A	Espectro de $^{13}\text{C}$ -n.m.r do polissacarídeo P de <i>Pereskia aculeata</i> , em $\bar{\text{o}}\text{xido}$ deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em $\delta$ p.p.m	75
7B	Espectro de $^{13}\text{C}$ -n.m.r do polissacarídeo P de <i>Pereskia aculeata</i> , em dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}-^2\text{H}_6$ ), a $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em $\delta$ p.p.m	76
7C	Espectro de $^{13}\text{C}$ -n.m.r do polissacarídeo P-1 de <i>Pereskia aculeata</i> , em $\bar{\text{o}}\text{xido}$ de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em $\delta$ p.p.m	77
8A	Espectro de massa (impacto eletrônico) do arabinitol penta- <u>0</u> -acetato, produto do polissacarídeo P, após degradação alcalina	87
8B	Cromatograma obtido por t.l.c do produto de hidrólise ácida ( $\text{HCl}$ 6 M, 18 h, $105^\circ$ ), no solvente e visualizador C	88
9	Espectro de $^{13}\text{C}$ -n.m.r de $\text{P}_\beta$ , em $\bar{\text{o}}\text{xido}$ de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em $\delta$ p.p.m	89
10	Espectro de massa (impacto eletrônico) do 2,3,5-tri- <u>0</u> -metilarabinitol, com seus fragmentos satélites contendo $\text{CD}_3\text{I}$ (massa + 3 u.m.a.), cujos m/z aparecem escritos na vertical	96
11A	Efeito do pH sobre a viscosidade reduzida do polissacarídeo P, da mucilagem de <i>Pereskia aculeata</i> , a $25^\circ$	106
11B	Efeito da adição de eletrólitos, em dife	

	rentes molaridades, sobre a viscosidade relativa do polissacarídeo P, da mucilagem de <i>Pereskia aculeata</i> , a 25 <sup>o</sup> ..	106
11C	Efeito da adição de eletrólitos, em diferentes molaridades, sobre a viscosidade reduzida do polissacarídeo P, da mucilagem de <i>Pereskia aculeata</i> , 25 <sup>o</sup> ..	107
11D	Efeito da variação da temperatura sobre a viscosidade relativa do polissacarídeo P, da mucilagem de <i>Pereskia aculeata</i> .....	108
11E	Determinação da viscosidade intrínseca do polissacarídeo P, da mucilagem de <i>Pereskia aculeata</i> .....	109

## LISTA DE TABELAS

TABELAS	I	Dados analíticos do polissacarídeo P ...	57
	II	Composição em monossacarídeos determinada por g.l.c. , na forma de acetatos de alditóis e polarimetria das diferentes <u>a</u> mostras da mucilagem de <i>Pereskia aculeata</i> .....	63
	III	Dados analíticos das frações obtidas após fracionamento do polissacarídeo P em coluna de DEAE-celulose, forma Cl <sup>-</sup> .....	64
	IV	Composição molar percentual dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, analisados por g.l.c. e g.l.c-m.s , das frações obtidas após fracionamento de P, em coluna de DEAE-celulose (Cl <sup>-</sup> ) .....	80
	V	Composição molar percentual dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, analisados por g.l.c e g.l.c-m.s dos polissacarídeos e oligossacarídeos de folhas de <i>Pereskia aculeata</i> .....	81
	VI	Tempo de retenção de <u>O</u> -metilarabinitol <u>a</u> cetatos, obtidos do polissacarídeo P, em coluna capilar (DB-210) a 195 <sup>o</sup> .....	93
	VII	Identificação e percentagem em acetatos de alditóis parcialmente metilados no polissacarídeo P através de: 1. Análise de metilação convencional; 2. Localização de <u>O</u> -acetil pelo método de BOUVENG modifica	

	do por CORRÊA et alii; 3. Introdução de $\underline{O}$ -CD <sub>3</sub> no lugar de grupos $\underline{O}$ -acetílicos .	94
VIII	Espectrometria de massa de $\underline{O}$ -metilalditóis acetatos e de seus satélites, contendo + 3 u.m.a. resultantes da presença de um grupo $\underline{O}$ CD <sub>3</sub> no polissacarídeo P ..	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ara	-	arabinose
Gal	-	galactose
Rha	-	ramnose
Fuc	-	fucose
GalA	-	ácido galacturônico
Araf	-	arabinofuranose
Galp	-	galactopirranose
P	-	polissacarídeo da mucilagem de <i>Pereskia aculeata</i> , após tratamento de SEVAG
P <sup>0</sup>	-	polissacarídeo P metilado e carboxi-reduzi <u>do</u>
P <sup>•</sup>	-	polissacarídeo P carboxi-reduzido e remeti <u>lado</u>
P <sub>β</sub>	-	polissacarídeo P beta-degradado
P-1	-	polissacarídeo obtido por hidrôlise ácida parcial (T.F.A 0,02 <u>M</u> , 100 <sup>0</sup> , 2 h), a partir do polissacarídeo P
S-1	-	sobrenadante alcoólico da hidrôlise ácida (T.F.A 0,02 <u>M</u> , 100 <sup>0</sup> , 2 h) a partir do polissacarídeo P
FA	-	fração de oligossacarídeos ácidos obtida a pós hidrôlise e fracionamento em coluna de Agl-X10, forma acetato
F-1	-	fração obtida após eluição do polissacarídeo P em coluna de DEAE-celulose, forma Cl <sup>-</sup> ,

com água.

F-2	- fração obtida após eluição do polissacarídeo P em coluna de DEAE-celulose, forma $\text{Cl}^-$ , com solução de NaCl 0,1 <u>M</u>
F-3	- fração obtida após eluição do polissacarídeo P em coluna de DEAE-celulose, forma $\text{Cl}^-$ , com solução de NaCl 0,25 <u>M</u>
F-7	- fração obtida após eluição do polissacarídeo P em coluna de DEAE-celulose, forma $\text{Cl}^-$ , HCl 0,1 <u>M</u>
DMSO	- dimetilsufóxido
Cetavlon	- brometo de hexadeciltrimetilamônio
EDTA	- ácido etilenodiaminotetraacético
MeOH	- metanol
EtOH	- etanol
TFA	- ácido trifluoracético
TMS	- tetrametilsilano
THF	- tetraidrofurano
c.p	- cromatografia em papel
t.l.c.	- cromatografia em camada delgada
g.l.c.	- cromatografia líquido-gasosa
g.l.c-m.s	- cromatografia líquido-gasosa acoplada a <u>es</u> pectrometria de massa
Rt	- tempo de retenção relativo
v/v	- volume por volume
p/v	- peso por volume
d.i.	- diâmetro interno
$\text{AcO}^-$	- acetato
min	- minuto
m/z	- massa por carga



p.a.s	-	percentagem da altura do fragmento satélite
i.e	-	impacto eletrónico
U.V.	-	ultra-violeta
I.V.	-	infra-vermelho
$^{13}\text{C-n.m.r}$	-	ressonância nuclear magnética de carbono treze
$^1\text{H-n.m.r}$	-	ressonância nuclear magnética de próton
$\mu_r$	-	viscosidade relativa
$\mu_{\text{red}}$	-	viscosidade reduzida
$ M ^2$	-	concentração molar ao quadrado.
u.m.a.	-	unidade de massa atômica

## RESUMO

A extração aquosa, a 50<sup>0</sup>, do pó acetônico de folhas de *Pereskia aculeata*, deu origem a um material mucilaginoso que, após precipitação com cetavlon e tratamento de SEVAG, originou o polissacarídeo P. Esse, contém 3,5% de proteína e é constituído por unidades de arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico numa relação molar de respectivamente 5,1: 8,2: 1,8: 1,0. A análise cromatográfica do polissacarídeo P, colorido com Azul de Procion, em coluna de Sephadex, bem como a de fracionamento em coluna de DEAE-celulose, indicaram que o mesmo é polidisperso.

Os espectros de <sup>13</sup>C-n.m.r em D<sub>2</sub>O das três principais frações obtidas em DEAE-celulose, F-2, F-3 e F-7 mostraram sinais correspondentes às unidades de arabinofuranose e ramnopiranosose e, para F-2 e F-3, também de éster metílico. Além disso, esses espectros foram bem mais definidos do que aqueles do polissacarídeo P em D<sub>2</sub>O e em DMSO-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>, que apresentou cinco sinais de arabinofuranose, correspondentes àqueles da fração F-2, e que aparecem sobrepostos a alguns extremamente amplos. Esses últimos correspondem às unidades de galactose, cujo movimento molecular é limitado, provavelmente, devido à própria complexação dos polissacarídeos. Essa estrutura baseada em pontes de hidrogênio, foi, então, dissociada após a passagem

através da coluna de DEAE-celulose.

As técnicas convencionais de análise química indicaram que o polissacarídeo P, possui na cadeia principal unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose interligadas (1+4) e parcialmente substituídas em O-3 por unidades de  $\beta$ -L-arabinopiranoses, que são por seu turno di-O-substituídas em O-2 e O-4 por outros terminais não redutores de  $\alpha$ -L-arabinofuranoses. As unidades de ácido galacturônico estão presentes internamente ou como grupos terminais não redutores ligados (1+2) às unidades de ramnopiranosose.

Na análise por  $\beta$ -eliminação em meio alcalino, ficou demonstrado, que a ligação polissacarídeo-proteína, ocorre entre arabinose e hidroxiprolina, enquanto que, o tratamento do polissacarídeo P com lítio metálico em etilenodiamina, originou um produto  $\beta$ -degradado, através das unidades de ácido galacturônico esterificadas.

Além de outros constituintes o complexo arabinogalactana-proteína apresenta 25 moles% de grupos O-acetil. A localização dos grupos O-acetil, como foi determinada pelo método de BOUVENG, ocorre principalmente como 3-O-acetil-arabinopiranosose (12%), 3-O-acetil-ramnopiranosose (11%) e 2-O-acetil-galactopiranosose (3%) e foi determinada por g.l.c.-m.s através da análise dos O-metil alditóis acetatos em coluna de DB-210 que, mostrou ser a mais eficiente, para a separação dos derivados de arabinitol. A distribuição mais exata foi efetuada substituindo os grupos O-acetil por O-trideuterometil, formando um polissacarídeo que foi sequencialmente O-metilado e convertido em acetatos de alditóis parcialmente deutero-O-metilados. A análise por

g.l.c-m.s ,interpretada juntamente com o mecanismo de fragmentação por i.e., mostrou que no heteropolímero os grupos O-acetil estão distribuídos em mais do que uma posição de um mesmo açúcar.

A solução aquosa do heteropolissacarídeo P que apresenta viscosidade máxima entre pH 4,4 - 5,6 à temperatura ambiente, sofre redução dessa propriedade reológica, tanto pela presença de sais como pela variação do pH. Todavia, apresenta a mesma viscosidade em diferentes temperaturas.

## SUMMARY

1. Aqueous extraction at 50° of the leaves of *Pereskia aculeata* gave rise to a mucilaginous material, which after Cetavlon precipitation and Sevag treatment, provided purified polysaccharide P containing 3.5% protein and units of arabinose, galactose, rhamnose and galacturonic acid in a 5.1: 8.2: 1.8: 1.0 molar ratio. Dyeing with Procion Blue, followed by fractionation on columns of Sephadex and of DEAE-cellulose showed that P was polydisperse.

2. DEAE-cellulose column chromatography of P gave 3 main fractions F-2, F-3, and F-7. Their  $^{13}\text{C}$ -n.m.r spectra, in  $\text{D}_2\text{O}$  solution, were well defined with recognizable signals corresponding to arabinofuranosyl and rhamnopyranosyl units, and in the case of F-2 and F-3, methyl ester. These spectra were much better defined than those of P in  $\text{D}_2\text{O}$  and in  $\text{DMSO}-^2\text{H}_6$ , which consisted mainly of 5 sharp signals of arabinofuranose, corresponding to those of fractions F-2, superimposed on extremely broad ones. The latter arise from material consisting mainly of galactosyl units, whose molecular motion is limited probably by high complexation of the components polysaccharides. Such a structure based on hydrogen bonding was thus dissociated on passage through the DEAE-cellulose column.

3. Overall chemical analysis of P, using conventional chemical techniques, showed a main chain consisting of (1→4)-linked-β-D-galactopyranosyl units partly substituted at O-3 with residues of β-L-arabinopyranose, which are in turn, di-O-substituted at O-2 and O-4 with nonreducing end-groups of α-L-arabinofuranose. Galacturonic acid units are present as nonreducing end-groups, or as internal ones linked (1→2) to rhamnopyranosyl residues.

4. The polysaccharide-protein linkage in P was found to consist of units of arabinose combined to hydroxyproline, and the presence of galacturonic acid residues esterified with methyl groups was consistent with degradation via β-elimination of polysaccharide P in ethylenediamine containing lithium.

5. Heteropolysaccharide P was also found to contain 25 moles % of O-acetyl groups, which were located by the method of BOUVENG. O-Acetyl groups were replaced with those of O-methyl and the partly O-methylated polysaccharide converted to a mixture of O-methylalditol acetates, which was examined by g.l.c-m.s, on DB-210, which is efficient in separating the arabinitol derivatives. Characterized were acetates of 3-O-methylarabinitol (12%), 3-O-methylrhamnitol (11%), and 2-O-methylgalactitol (3%). A more exact distribution of O-acetyl groups was achieved via a similar replacement, but incorporating trideuteromethylation, followed by conversion to a mixture of corresponding trideuteromethylated alditol acetates. G.l.c-m.s analysis showed the location of the ester group in each type of structural unit and that they occurred not in one position but are distributed throughout the available hydroxyl groups of each unit.

6. Maximum viscosity of polysaccharide P was observed at 25° and at pH 4.4 to 5.6 . Reduction of viscosity occurred on addition of salts, but is invariable with the temperature.

## 1. INTRODUÇÃO

**A terra será maldita por causa da tua obra, tu tirarás dela o teu sustento à força de trabalho. Ela te produzirá espinhos a abrolhos, e tu terás por sustento as ervas da terra. Tu comerás o teu pão no suor do teu rosto. (Gên. 3:17-19)<sup>23</sup>**

Fatores climáticos, econômicas, políticos e sociais trazem constantemente uma consequência conhecida do homem há milênios: a fome. Abatendo-se sobre a população biologicamente vulnerável, sobretudo sobre as crianças, ela pode originar certos traços e deformações que serão absolutamente irreversíveis. Não causa apenas sofrimento de imediato, porém, rouba do indivíduo boa parte daquilo que seu potencial genético estava destinado a realizar. A desnutrição permanente é muito mais grave; origina doenças colaterais que podem levar o indivíduo à morte. Apesar de existir uma diferença entre a fome e a desnutrição, a segunda pode ser consequência da primeira, se esta continuar por períodos longos. A desnutrição por insuficiência constante de alimentos afeta tanto os habitantes das cidades como os do campo.

O relatório da FAO<sup>55</sup> descreve que os países subdesenvolvidos, com 72% da população mundial, só dispõem para sua alimentação de pouco mais da terça parte dos alimentos disponíveis no mundo, porque sua produção per capita é menor que a dos desen



volvidos e, ainda, porque exportam os alimentos básicos. Ainda, segundo dados FAO, a produção de alimentos entre 1982-83 havia decrescido em 0,5%, para essa mesma população.

Resumidamente nosso continente importa cerca de 10-15% dos alimentos que consome. Esta não é uma particularidade da América Latina, mas um traço geral do mundo pobre. Já os E.U.A. sózinhos, são responsáveis por nada menos que 50% das exportações mundiais de trigo, 30% de arroz, 60% das de grãos forrageiros e 50% das plantas oleaginosas<sup>142</sup>.

No Brasil a situação nutricional não difere muito da dos outros países da América Latina. Em geral, situa-se na média do consumo energético e proteico dos países subdesenvolvidos.

Em Curitiba, 1984<sup>74</sup>, o deficit em Kcal entre requerimento e consumo aparente de energia em três segmentos populacionais era: favela 14,2%, área carente 17,86% e classe média 7,92%. Já o deficit em proteínas era: favela 24,1%, áreas carentes 15,1% e classe média 5,7%. Esses valores são ainda mais graves diante de um deficit do valor energético total (VET) do indivíduo, já que a proteína passa a ser usada para suprir pelo menos em parte, as Kcal faltantes e requeridas pelo organismo.

Relacionando-se o aspecto energético, observa-se que esse está intrinsicamente relacionado com um dos conceitos mais modernos de vida, onde muitos autores a definem como "um processo de acúmulo e desprendimento de energia por meios metabólicos", subentendendo-se que um organismo pode alterar seu estado energético através de seu metabolismo. Com a finalidade de possuir à sua disposição as calorias de que necessitam, os organismos vivos sintetizam macromoléculas que são utilizadas racionalmente

como reserva energética. Nesse sentido os polissacarídeos, como o amido e o glicogênio, constituem a fonte primária de energia dos vegetais e animais, respectivamente. Além dessas funções primordiais exercidas pelos polissacarídeos sob o ponto de vista biológico, outras sob o ponto de vista comercial e/ou industrial, também passam a ser exercidas por tais moléculas e que justificam o seu estudo.

## 1.1 FUNÇÕES E USOS INDUSTRIAIS DOS POLISSACARÍDEOS<sup>108,114</sup>

Os polissacarídeos apresentam numerosas aplicações em produtos de consumo onde são usados essencialmente como espessantes e agentes gelificantes e como estabilizadores para sistemas dispersos, conferindo textura, sabor, aparência e coloração. Promovem um aumento na viscosidade em produtos alimentares ou previnem a redeposição da sujeira em detergentes. Muitos polissacarídeos alteram as propriedades de soluções aquosas ou dispersões.

A propriedade de um emulsificante consiste em obter uma fina dispersão e, a de um estabilizante a de manter uma dispersão fina de duas ou mais fases diferentes. Na prática contudo é difícil distinguir a emulsificação da estabilização.

Os espessantes, como o próprio nome indica, são usados para aumentar a viscosidade de soluções aquosas ou suspensões. Aumentam portanto, a resistência de fluxo de um líquido. Os polis

sacarídeos também interagem com substâncias iônicas tais como as proteínas. Como as proteínas são anfóteras, a interação do polissacarídeo com proteínas depende muito do pH do sistema.

A solubilidade de polissacarídeos em água fria é uma importante propriedade universal. A goma de "locust bean", agar e alguns tipos de carragenanas devem ser aquecidas para serem dissolvidas. Outras soluções, tais como sais, açúcares e alcoois, diminuem a solubilidade de polissacarídeos. Polissacarídeos ácidos, tais como ácidos algínicos, pectina e carboximetilcelulose (CMC), são insolúveis em baixo pH (abaixo de 3,0). Na presença de íons de metal divalente algumas pectinas e alginatos podem tornar-se insolúveis. Vários polissacarídeos formam complexos insolúveis em altos valores de pH, quando íons de metais divalentes como cálcio estão presentes.

Pectinas, agar, misturas de gomas de xantan com gomas de sementes e carragenanas (K e L) formam géis que são rígidos e têm distintas formas estruturais. Variam a textura quando incorporadas em amaciantes, promovem a elasticidade em goma de mascar e aumentam a rigidez em géis.

Polissacarídeos são também usados em alimentos para estabilizar sólidos, líquidos e dispersões gasosas em água.

Emulsões são dispersões líquidas, suspensões são dispersões sólidas e espumas são dispersões gasosas.

Os polissacarídeos servem para prevenir a separação de fases dispersas. Uma emulsão é uma mistura íntima de dois líquidos imiscíveis nos quais uma fase é dispersa através de outra,

como pequenas gotas. Para manter essa mistura homogênea, polissacarídeos são acrescentados como estabilizadores da emulsão. Aparentemente, os polissacarídeos funcionam como espessantes da fase aquosa assim que a sua viscosidade é igualada ou levemente aumentada em relação à fase oleosa.

Agentes de suspensão são usados para dispersar partículas sólidas (em lugar de glóbulos líquidos), provocando uma uniformidade através da fase líquida (uma suspensão), principalmente por aumentar a viscosidade de suspensões.

Estabilizadores de espumas são relacionados com os emulsificantes, desde que são essencialmente uma fase de gases em líquidos ou sólidos. Os polissacarídeos afetam as propriedades de superfície (ex. tensão interfacial) de espumas. Tais polissacarídeos como carragenanas, alginato de sódio, ou gomas de semente frequentemente reagem com proteínas para formar uma espuma estável.

Na indústria de laticíneos os polissacarídeos são frequentemente adicionados a queijos processados e a queijos fundidos para eliminar a formação de lágrimas pendente (sangramento) e a sinerese que compreendem uma indesejável perda de água.

Os polissacarídeos descritos como espessantes e agentes de cola, têm aplicações industriais específicas. Agentes colantes possuem capacidade para formar filmes e têm propriedades ligantes. Podem ser usados em membranas de superfície para aumentar a força e melhorar a propriedade de superfície. Na indústria têxtil e de papel é que são mais empregados. Os polissacarídeos de uso comercial classificam-se de acordo com sua origem em naturais e semi-sintéticos. Os polissacarídeos naturais incluem extratos de plantas marinhas, exudatos de planta, extratos de

sementes e raízes e polissacarídeos produzidos por microorganismos de fermentação. Entre os semi-sintéticos incluem-se os derivados de celulose, os de pectina com baixo conteúdo em metoxil, alginato de propileno glicol, alginato de trietanolamina e derivado hidroxipropileno de goma de guar.

Muitas das aplicações dos polissacarídeos estão relacionadas com o conhecimento de sua estrutura química e, isto foi observado por REES<sup>109</sup> quando estudou a variação estrutural das galacturonanas substituídas.

## 1.2 POLISSACARÍDEOS CONTENDO UNIDADES DE ÁCIDO GALACTURÔNICO: PECTINAS, GOMAS E MUCILAGENS.

As pesquisas sobre polímeros naturais de ácido galacturônico datam do início do século e, foi em 1940 que o modo das ligações  $\alpha$ -D-(1→4) entre as unidades foi estabelecido<sup>132</sup>. A existência de grupos metílicos em várias proporções, assim como a ampla variação no peso molecular e suas implicações sobre as propriedades, tais como solubilidade e viscosidade, foram logo reconhecidas.

Os exudatos gomosos e as substâncias mucilaginosas são constituídas por uma cadeia básica formada por unidades de D-GalpA interligadas  $\alpha$ -(1→4). Essa cadeia pode encontrar-se modificada em alguma proporção, pela esterificação dos grupos carboxílicos com metanol e por intercalações na cadeia principal de unidades de outros grupos de açúcares, constituindo as cadeias laterais e/ou ramificações<sup>29</sup>.

ALBERSHEIM e colaboradores<sup>2,3,82</sup> descreveram a forma

como as galacturonanas substituídas podem estar envolvidas na estrutura da parede celular.

D-Galacturonanas não substituídas apresentam um valor alto de polarimetria,  $[\alpha]_D + 250^\circ$  ou mais; o contrário ocorre quando ramificadas por L-arabinanas, que dão um valor negativo alto,  $[\alpha]_D - 150^\circ$  ou mais, ou quando ramificadas por D-galactanas, que dão um valor positivo baixo. Já as substâncias pecticas que têm grande proporção de açúcares neutros como ramificações, apresentam um valor baixo de rotação ótica específica<sup>33,132</sup>.

Vários são os termos propostos para extratos de planta contendo unidades de ácido galacturônico sem que, a estrutura molecular envolvida, tenha sido esclarecida de forma global.

A denominação "pectinas" é usada para cadeias de ácido urônico não modificadas com ligações (1→4) entre as unidades de  $\alpha$ -D-GalpA parcialmente esterificadas; unidades de L-Rhap com ligações  $\alpha$ -(1→2) podem ocorrer no interior da cadeia. As pectinas totalmente desesterificadas são denominadas "ácidos pecticos"<sup>132</sup>.

O conteúdo de metoxil em polissacarídeos pecticos de frutas e tubérculos como maçã, limão, framboesa, beterraba e outros varia de 0-10% ou mais, em peso, o que significa que mais de 50% dos grupos carboxílicos podem estar esterificados. Grupos O-acetílicos, também podem estar presentes nas posições O-2 ou O-3 da cadeia principal em um conteúdo de aproximadamente 4%. Esses grupos substituintes têm a sua importância química, porque influenciam na propriedade de gelificação das pectinas. O comprimento da cadeia varia de 200 a mais de 1000 unidades de açúcar e, tem efeito sobre a viscosidade de suas soluções aquo-

sas diluídas.

A ocorrência de unidades de  $\underline{\underline{L}}\text{-Rhap}$  em posições consecutivas ou isoladas, mas possivelmente em espaços regulares da cadeia principal, foi observada em polissacarídeos ácidos complexos de farinha de grãos de soja<sup>9</sup> onde foram encontrados blocos com a seguinte sequência repetitiva:  $\left[ \underline{\underline{D}}\text{-GalpA-(1→4)-}\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-GalpA-(1→2)-}\underline{\underline{L}}\text{-Rhap-(1→2)-}\underline{\underline{L}}\text{-Rhap} \right]$ . Em outros, foram isolados  $\left[ \alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-GalpA-(1→2)-}\underline{\underline{L}}\text{-Rhap-(1→4)-}\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-GalpA-(1→2)-}\underline{\underline{L}}\text{-Rhap} \right]$ , alternados. Unidades de  $\underline{\underline{Rhap}}$  ligadas em similar alternância, foram encontradas em extratos de casca de soja<sup>10</sup> e em parede celular de plantas<sup>86</sup>, após cuidadosa separação e caracterização dos oligossacarídeos ácidos no hidrolisado ou produtos de acetólise. Algumas unidades de  $\underline{\underline{L}}\text{-Rhap}$  podem estar unidas em pectinas de casca de salgueiro branco<sup>136</sup>. Em pectinas de folhas e caules de lucerne<sup>11</sup> bem como em paredes celulares de sicômero<sup>135</sup>, também ocorre alternância de unidades neutras e ácidas. Há numerosas ocorrências nas quais o modo de ligação dos componentes de  $\underline{\underline{L}}\text{-Rhap}$  de substâncias pectícas, têm apresentado a sequência  $\left[ \alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-GalpA-(1→2)-}\underline{\underline{L}}\text{-Rhap(1→)} \right]$ , tanto que a organização estrutural desses açúcares neutros parece ser bastante definida.

As gomas e mucilagens são polímeros identificados como exudatos gomosos e compreendem um número de ramnogalacturonanas complexas substituídas<sup>132</sup>. As primeiras são diferenciadas, por um senso prático, pelo processo de extração, desde que podem ser isoladas na forma homogênea por extração aquosa ou por tratamento com alcali.

Nas mucilagens de casca e de semente, como de linhaça, foram obtidas duas frações acídicas, pelo fracionamento com aceta

to de cobre, uma contendo  $\underline{\underline{L}}\text{-Galp}$  e a outra  $\underline{\underline{L}}\text{-Galp}$  e  $\underline{\underline{L}}\text{-Fucp}$  como grupos terminais. O polissacarídeo ácido da mucilagem de semente de agrião é, da mesma maneira, uma galacturonana em que  $\{4\text{-O-Me-}\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-GlcA-(1}\rightarrow\text{4)-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp-(1}\rightarrow\text{)}\}$  e, o  $\{\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Xylp-(1}\rightarrow\text{4)-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp-(1}\rightarrow\text{)}\}$  estão ligados ao O-4 da cadeia de  $\underline{\underline{L}}\text{-Rhap}$ <sup>138</sup>. Na planta aquática *Brasenia schreberi* (Nymphaeaceae) é encontrada a mucilagem de Junsai<sup>81</sup> que contem 7 ou 8 unidades monossacarídicas diferentes.

As unidades de  $\underline{\underline{L}}\text{-Rhap}$  podem estar  $\alpha$ -ligadas como ocorre em mucilagem de raízes e câmbio ou  $\beta$ -ligadas, como em sementes e extrato de casca, Já, a ocorrência da cadeia de unidades  $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}$  é universal<sup>132</sup>.

### 1.3 POLISSACARÍDEOS CONTENDO UNIDADES DE ÁCIDO URÔNICO ALTAMENTE O-SUBSTITUÍDOS

Os polissacarídeos contendo unidades de ácidos galacturônico e altamente O-substituídos, apresentam uma disposição de outras unidades de açúcares neutros pouco esclarecida e, que podem constituir metade ou mais do carboidrato total. Essas ramificações podem ocorrer pela existência de  $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-GlcA}$  ligado ao O-6 ou O-4 de  $\underline{\underline{D}}\text{-Galp}$ ,  $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-GlcA}$  ligada ao O-4 de  $\underline{\underline{L}}\text{-Fucp}$  ou ainda  $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-GlcA}$  ligada ao O-2 de  $\underline{\underline{D}}\text{-Manp}$  juntamente com uma galactana ligada  $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$ <sup>8,9</sup>. Cadeias ramificadas de  $\underline{\underline{L}}\text{-Arap}$ ,  $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Xylp}$ ,  $\alpha\text{-}\underline{\underline{L}}\text{-Fucp}$  e  $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp}$  como fragmentos estão provavelmente em cadeias laterais ligadas ao O-4 dos resíduos de  $\underline{\underline{L}}\text{-Rhap}$ , como foi identificado por análise de metilação de complexos acídicos de farinha de grãos de soja e ao O-3 de alguns resí



duos de  $\underline{D}$ -GalpA como detectados em um produto de hidrólise enzimática de um material pectico de casca de limão. Análises de metilação de pectina de casca de limão, de casca de uva de seus derivados carboxireduzidos mostraram uma estreita correspondência na natureza e proporção de suas unidades de açúcares. Também, os oligossacarídeos obtidos por fragmentação parcial dos polissacarídeos, confirmaram que o arranjo das unidades de açúcares são similares a todos os exemplos já estudados<sup>114</sup>. Observou-se em paniculatan, *Hydrangea paniculata*, que o 0-3 de algumas unidades de  $\underline{L}$ -Rhap estão parcialmente acetiladas. Já na mucilagem de abelmosches notou-se a presença de pequena proporção de proteína ligada ao polissacarídeo<sup>132</sup>. Há um número de citações de mono-0-metil açúcares como constituintes de polissacarídeos pecticos, como: 2-metil éteres de  $\underline{D}$ -Xylp e  $\underline{L}$ -Fucp e L-Rhap<sup>42</sup>. Na mucilagem de olmo notou-se a presença de unidades de 3-0-Me- $\underline{D}$ -Galp(1→4)-3-0-Me- $\underline{D}$ -Galp(1→ localizadas em posição 0-4 das unidades de  $\underline{L}$ -Rhap interligadas (1→2) na cadeia principal<sup>21</sup>. O 4-metil éter do  $\underline{D}$ -Glc pA ligado usualmente a  $\underline{D}$ -Galp como 4-0-Me- $\alpha$ - $\underline{D}$ -Glc pA-(1→4)- $\underline{D}$ -Galp-(1→, é um componente de mucilagem como a de paniculatan<sup>128</sup>. A pectina de opium de papoula contém unidades 4-0-Me- $\alpha$ - $\underline{D}$ -Glc pA-(1→2)- $\beta$ - $\underline{D}$ -Xylp-(1→2)- $\beta$ - $\underline{D}$ -Xylp-(1→<sup>132</sup>. Esta estrutura de ácido aldobiurônico é normalmente encontrada em xilanas<sup>37</sup>. Em paniculatan, onde 50% do  $\underline{D}$ -GalpA faz parte da cadeia principal foi localizada a sequência 4-0-Me- $\alpha$ - $\underline{D}$ -Glc pA-(1→4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -GalpA-(1→, em cadeias laterais<sup>132</sup>.

Em mucilagem e gomas contendo unidades de ácido galacturônico altamente substituídas, a proporção de  $\underline{L}$ -Rhap na cadeia principal é relativamente alta. A distribuição de açúcares neutros parece viável mas já foi comprovada, através de hidrólise suave,

a existência de pectina contendo poucas unidades Rhap lábeis a ácido, posicionadas em intervalos regulares da cadeia de galacturonana. Os produtos na forma de blocos, com uma uniformidade de peso molecular e com cerca de 30 unidades de ácido  $\alpha$ -D-ga-lacturônico, foram obtidos após fracionamento do material hidrolisado em coluna de Sephadex G-50. A conformação preferida do poligalacturonato, com unidades piranosídicas ligadas (1→4) diaxialmente é uma fita retorcida anelada, e com uma 3a. unidade repetida; já a inserção de unidades de  $\beta$ -L-Rhap ligadas (1→2) introduz uma dobra na cadeia.

A distribuição botânica de vegetais que contenham unidades de D-apiose ramificada como parte integral dos componentes pécticos foi estudada e é uma característica de certas famílias como: Zosteraceae, Potamogetonaceae e Lemnaceae, todas plantas aquáticas. Tais polissacarídeos foram isolados e analisados nas ordens Tilia spp. (Malvales) e, no dente de leão *Taraxacum Kok-sagha* da família Asterales. No pólem de pinheiro de montanha, formado por uma galacturonana, encontrou-se monômeros de  $\beta$ -D-Xylp ligados ao C-3 da cadeia principal<sup>132</sup>.

Em canais e estigma de certas plantas encontram-se polisacarídeos ácidos constituídos por arabinogalactanas e cujas estruturas que são bastante complexas serão relatadas a seguir.

#### 1.4 ARABINOGALACTANAS

As arabinogalactanas e os complexos arabinogalactanas proteínas encontram-se amplamente distribuídos em tecidos vegetais, principalmente em exudatos gomosos e em culturas de células. Já

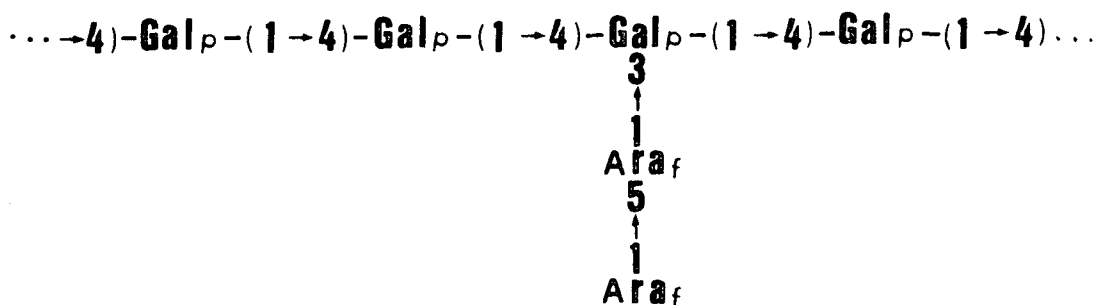
as glicoproteínas contendo arabinogalactanas como componente polissacarídico são encontrados em paredes celulares tanto de vegetais inferiores como de superiores.<sup>33,56,132</sup>

Moléculas quimicamente constituídas por arabinogalactanas foram encontradas também em pulmão bovino<sup>112</sup> e na superfície celular de um tripanosomatídeo (*Crithidia fasciculata*)<sup>64</sup> sugerindo que a distribuição desses polissacarídeos não se restringe somente ao reino vegetal e, dentro do aspecto fisiológico, o seu papel biológico ainda não está bem definido<sup>33</sup>.

Em contraste com outros polissacarídeos de paredes celulares não celulósicos que são essencialmente lineares ou escassamente ramificados, as moléculas de arabinogalactanas têm uma estrutura multiramificada.

Segundo ASPINALL<sup>15</sup> as arabinogalactanas classificam-se em três grupos; a saber:

Grupo I - arabino-4-galactana. São tidos como polímeros lineares, compostos por unidades de galactopiranoose interligadas através  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), com a seguinte estrutura proposta para o polissacarídeo isolado de cotilédones de grãos de soja:

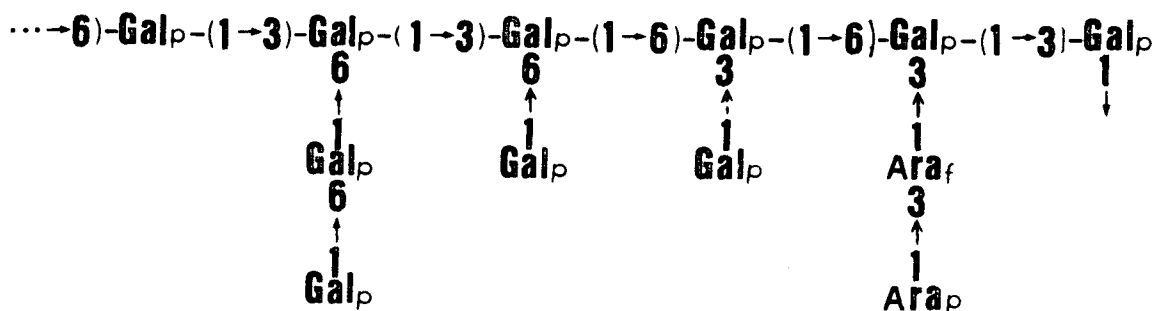


onde se observa que a cadeia principal de galactana pode apre-

sentar ramificação por arabinose, provavelmente como arabinosil-oligossacarídeos. Em alguns ensaios verificou-se a presença, também, de unidades de ramnose, xilose e de ácidos urônicos, enquanto que nenhuma associação com proteínas foi ainda constatada.

Os complexos macromoleculares arabino-4-galactana encontram-se distribuídos em complexos pecticos localizados em folhas, sementes e bulbos, bem como em madeiras de coníferas de onde são extraídos pelo processo de compressão<sup>33</sup>.

Grupo II - arabino-3,6-galactanas. Para as espécies do gênero *Larix*<sup>33</sup> foi proposta a seguinte estrutura parcial:



onde se observa ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) na cadeia principal, com ramificações em 0-6 e 0-3.

As arabino-3,6-galactanas são as mais abundantemente encontradas no reino vegetal. Em plantas superiores foram localizadas em sementes, folhas, raízes e frutos. Foram encontradas, ainda, na seiva do xilema e em filtrados de culturas de células de tecidos vegetais. Nesse grupo enquadram-se as gomas de plantas. Essas macromoléculas são encontradas em frações de

hemiceluloses, solúveis em água e, são extraídas tanto de madeiras duras (angiospermas), como de madeiras moles (gimnospermas).

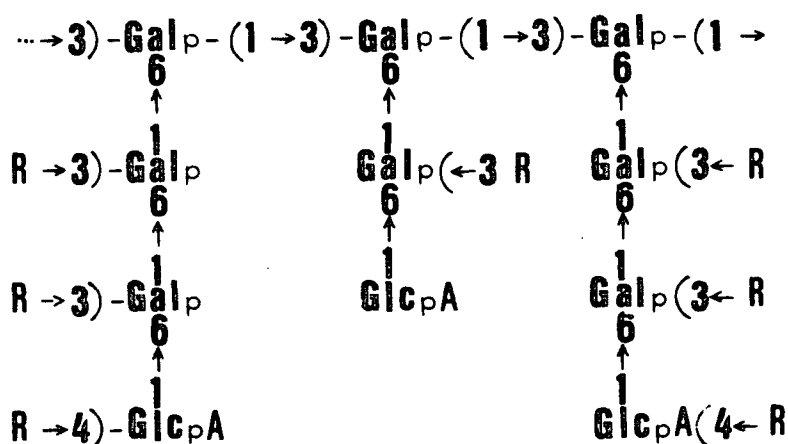
Encontram-se em baixas concentrações nas madeiras duras e coníferas, com exceção das espécies do gênero *Larix*, onde são encontradas interiormente em altas concentrações. Por sua relativa solubilidade as arabinogalactanas são extraídas com água, diretamente da madeira pulverizada, distinguindo-se, de outros polissacarídeos solúveis em água, encontrados em paredes celulares e que são removidos da madeira, após delignificação. As arabinogalactanas estão concentradas no interior da madeira, uniformemente distribuídas em vários tecidos.

A relação entre os componentes monossacarídicos principais, galactose e arabinose é de 2,6 a 7,8. Em alguns casos o ácido glucurônico encontra-se em posição terminal não redutora e, pode atingir até 7% do açúcar total (*Larix lyalii*). Em *Larix occidentalis* não foi encontrado ácido urônico. As arabinogalactanas de *Larix* geralmente ocorrem como dois componentes; um com alto P.M., entre 37000-100000 (70-95%) e outro com P.M. menor entre 7500-18000 (5-30%). Também, uma arabinogalactana com alto P.M., foi isolada de *L. occidentalis*, todavia, correspondia a apenas 20% do total. Nesse mesmo vegetal a razão galactose: arabinose é maior no componente de menor P.M., e a disposição da arabinose nas duas frações é diferente.

Numa revisão sobre o gênero *Larix*, de onde havia sido isolada uma arabinogalactana, o uso da degradação alcalina, via  $\beta$ -eliminação, indicou que a arabinose estava presente não somente nas ramificações, mas, também na cadeia principal da mo-

lêcula. Isso foi anteriormente observado em condições de hidrólise suave ácida, na qual somente as ligações furanosídicas poderiam ser quebradas e conduziam a uma extensiva depolimerização da arabinogalactana com P.M. elevados (G.P. ≈ 600), formando fragmentos menores (G.P. 20-48). A solução de arabinogalactana a 0,1 M não apresentou absorção acima de 225 nm, indicando ausência de proteína. Também nitrogênio não foi encontrado em *L. occidentalis*. As arabinogalactanas das espécies do gênero *Larix*, têm uso industrial como aditivos alimentares, como agregantes em comprimidos e são também usadas em litografia.

A goma arábica, também do segundo grupo de ASPINALL, tem grande importância industrial. É exudada de troncos de *Acacia senegal* e sua estrutura, como aquela do gênero *Larix*, possui ligações de galactopiranosil β-(1→3) na cadeia principal, com ramificações do tipo β-(1→6). Difere das arabinogalactanas de *Larix* e do endosperma do falso centeio, por apresentar unidades de glucosil na cadeia lateral, conforme a seguinte estrutura parcial:



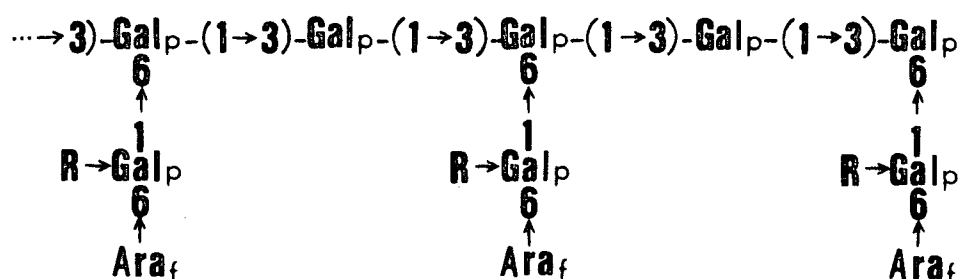
onde R representa mono ou oligossacarídeos envolvendo L-ramno-



para a goma extraída de *Anogeissus latifolia* (goma ghatti), onde R representa: Ara-(1→6)-Man; Ara-(1→2)-Ara-(1→6)-Man; Ara-(1→3)-Ara-(1→6)-Man; Ara-(1→5)-Ara-(1→6)-Man ou Ara-(1→3)-Gal.

Componentes de complexos pecticos com galacturonoramnana como cadeia principal, possuindo cadeias laterais de arabinogalactana, foram isoladas de paredes celulares de *Acer callus*. Em pectinas de *Panax ginseng*, as cadeias laterais podem estar ligadas a unidades de ramnose e, em pectina de *Zostera marina*, por unidades de ácido galacturônico.

Grupo III - arabino-3,6-galactana-proteína. O terceiro grupo é representado pelo complexo arabinogalactana-proteína extraído de células e suspensão de culturas de endospermas do falso centeio (*Lolium multiflorum*), representada pela seguinte estrutura<sup>33</sup>:



Essa macromolécula tem um P.M. de  $2 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$ , onde 95% de carboidratos estão associados a 5% de proteínas. O componente polissacarídico consiste quase que exclusivamente de unidades de galactose e arabinose na proporção de 1:1,7. Nenhum ácido urônico foi encontrado. Na estrutura, R representa ligação Ara<sub>f</sub>-(1→3). Frequentemente arabinose terminal encontra-se na forma piranosídica, como nas arabinogalactanas-proteína de *Fontinalis*



*antipyretica* e de *Nicotiana tabacum*. Os baixos valores de rotação óptica positiva ou negativa, provavelmente refletem a preponderância de configuração  $\beta$ -D- e a  $\alpha$ -L de unidades de galactose e arabinose, respectivamente.

Na ligação entre o polissacarídeo e a proteína, a hidroxiprolina é apontada como o elo de ligação, devido a sua frequente presença em complexos arabinogalactanas-proteína<sup>36</sup>. A estabilidade da porção galactana de arabinogalactana do endosperma do trigo ao tratamento alcalino drástico (NaOH 5 M, 100°C, 24 horas), bem como o aumento da hidroxiprolina nos produtos de degradação, indicam ligações glicosídicas envolvendo esse aminoácido e a galactose. Isso foi confirmado pelo isolamento e identificação de 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-L-prolina após a degradação da amostra. Também ligações álcalis lábeis de D-galactosil-O-serina foram encontradas em proteoglicanas isoladas de folhas de *Cannabis sativa*, possivelmente presentes na cadeia principal de arabinogalactana-proteína. Uma outra ligação álcali estável do tipo glicosil-hidroxiprolina foi encontrada em folhas de *Cannabis sativa* da África do Sul, porém, não na da Tailândia. Assim, em um grande número de proteoglicanas de animais e plantas, mais de um tipo de ligação carboidrato-aminoácido pode ser encontrada em uma molécula do polímero.

Na determinação da estrutura química fina, vários métodos alternativos podem ser utilizados, entre esses enquadra-se a metilação. Todavia na avaliação dos derivados metilados tem-se observado que, durante a derivatização do polímero, reações degradativas podem ocorrer, como é o caso da  $\beta$ -eliminação cujos mecanismos passaremos a discutir.

## 1.5 PROCESSOS DEGRADATIVOS DOS POLISSACARÍDEOS: β-ELIMINAÇÃO

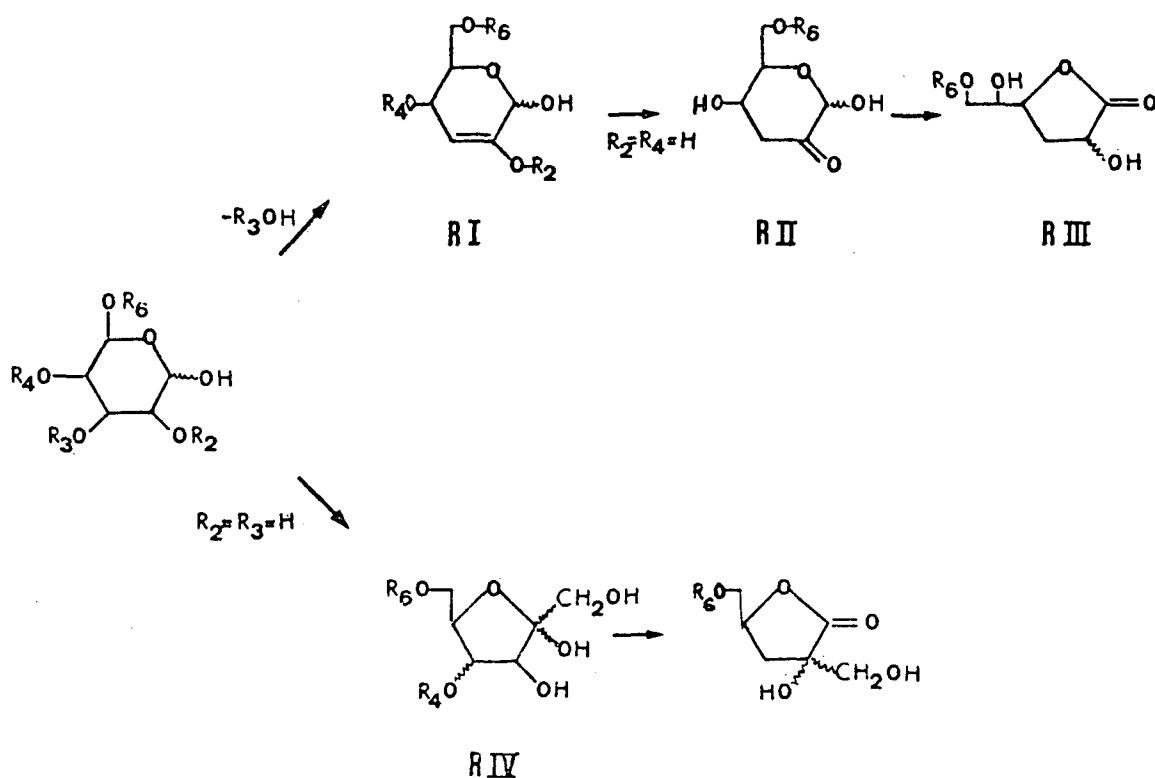
Em geral, os glicosídeos são estáveis a condições alcalinas. Entretanto, polissacarídeos ácidos em meio básico podem sofrer reações degradativas chamadas de β-eliminação, pela remoção, através do ataque nucleofílico do H de C-5 e de grupos funcionais em O-4 com conseqüente quebra de ligações glicosídicas. Os grupos que podem sofrer esse mecanismo de reação compreendem unidades redutoras, e os grupos carboxílicos das unidades de ácido urônico presentes na molécula, bem como de seus derivados esterificados.

### a. Degradação através de grupos redutores

Quando tratados com base (esquema 1) os grupos redutores dos carboidratos normalmente em soluções aquosas originam o composto 3-deoxihex-2-enopiranosose (RI)<sup>7</sup>. Na análise desse mecanismo de β-eliminação foi observado que a reação ocorre mais facilmente quando existe um grupo substituinte em O-3 do anel piranosídico. Quando não houver nenhum substituinte na posição O-2 a cetonação pode ocorrer, originando o 3-deoxiglicose-2-ulose (RII) que pode sofrer um rearranjo tipo ácido benzílico, formando um par epimérico do ácido 3-deoxialdônico, conhecido como ácido metassacarínico (RIII)<sup>129</sup>. Já a substituição em O-2 origina o 3-deoxihex-2-enopiranosose (RI).

Quando um açúcar redutor apresentar um substituinte em O-4, a seqüência da degradação envolve rearranjo de aldose para cetose, seguido de β-eliminação catalizada pela base e dando um

par epimérico do ácido 2-O-hidroximetil-3-deoxialdônico, ou ácido isocacarínico (RIV).



<sup>15</sup>  
Esquema 1 -

Degradação através de grupos redutores:  
**RI**, 3-deoxihex-2-enopirranose; **RII**, 3-deoxiglicó-2-ulose; **RIII**, ácido 3-deoxialdônico; **RIV**, ácido-2-O-hidroximetil-3-deoxialdônico.

As unidades 2,3-di-O-substituídas são estáveis a degradação catalizada por base à temperatura ambiente. Porém são extremamente lábeis a ácidos com liberação do substituinte em 2-O, originando uma unidade 3-O-substituída que pode apresentar subsequente degradação em meio básico<sup>7,12</sup>. Já a formação do ácido sacarínico (COOH-COH(CH<sub>3</sub>)-CHOH-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) é de especial importância para polissacarídeos contendo cadeia principal com

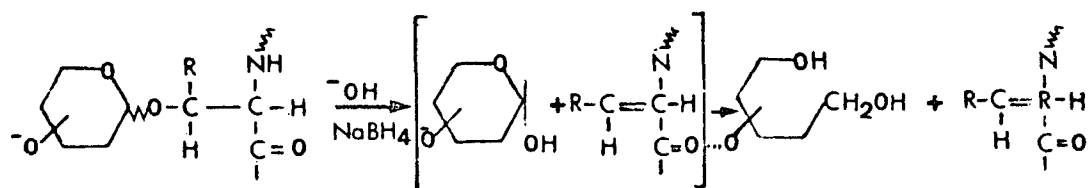
ligações do tipo (1→3), com ou sem cadeias laterais e, também, para glicanas 4-0-ligadas. Como a β-eliminação expõe a unidade redutora subsequente da cadeia, a degradação pode se processar ao longo da cadeia, como uma reação denominada de "peeling".

Para polissacarídeos constituídos por ligações (1→3) ou (1→4) na cadeia principal e substituídos por cadeias laterais em 0-6, o processo de degradação ocorre da mesma maneira que para glicanas lineares, mas com a formação do ácido 0-glicosil-sacarínico através das unidades ramificadas. Esse tipo de depoli-merização foi observado com a galactomanana de guar que é constituída por uma cadeia 4-0-β-ligada<sup>15</sup>.

Estudos em modelos de compostos contendo unidades redutoras 3,4-di-0-substituídas têm revelado que os dois substitu-tes são eliminados provavelmente com a formação de diferentes tipos de produtos de degradação dessas unidades<sup>13</sup>.

Em geral, os estudos de degradação alcalina de grupos redutores, têm um valor limitado para estudos estruturais, con-tudo são importantes em função dos diferentes oligossacarídeos produzidos. A degradação catalizada por base, que frequen-temente ocorre sobre as unidades de hexuronato, expõe grupos reduto-res nos quais pode ocorrer a subsequente β-eliminação. A ampli-tude dessas reações depende dos tipos de ligações envolvidas en-tre os grupos expostos.

Em algumas glicoproteínas, cadeias de oligossacarídeos ligados glicosidicamente à serina ou treonina são liberadas por tratamento com base. Cadeias de oligossacarídeos permanecem es-táveis à base quando a β-eliminação é conduzida sob solução a-quosa de NaOH contendo NaBH<sub>4</sub>, conforme a reação a seguir<sup>15</sup>:



### Reação de $\beta$ -eliminação açúcar-proteína

Polissacarídeos que apresentem cadeias O-glicosidicamente ligadas à proteína, em proteoglicanas, são desta mesma forma liberadas, sem acentuada degradação pelo mecanismo de "peeling".

#### b. Degradação através de unidades de ácidos urônicos.

O mecanismo de  $\beta$ -eliminação via unidades de ácidos urônicos ocorre quando essas estão esterificadas e/ou 4-O-substituídas por grupo éter ou grupo glicosil e resulta na eliminação de 4-O-substituintes com a formação de unidades de hex-4-enopirano siluronato. Essa reação foi inicialmente postulada como uma reação competitiva na saponificação de pectinas altamente esterificadas em soluções aquosas<sup>91, 92</sup>. Os ácidos pectícos demonstraram ser mais resistentes a depolimerização do que as pectinas ou as substâncias pectícas, que apresentam unidades de ácidos D-galacturônico esterificadas. KERNER denominou a esse fenômeno de " $\beta$ -dealcoilação" e NEUKOM e DEUEL apresentaram a prova conclusiva da depolimerização de material pectíco, quando demonstraram que as pectinas são fragmentadas facilmente em soluções alcalinas, ou em meio tamponado (pH 6,8), dando fragmentos de oligossacarídeos

e liberando o 4-deoxi-L-threo-hex-4-enopiranosiluronato<sup>84</sup>.

A depolimerização é um processo rápido e pode ser acompanhada pela mudança da viscosidade ou pelo aumento da absorção em U.V (232 nm), que indica a presença de um ácido carboxílico  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado<sup>84</sup>. O ácido colânico, um polissacarídeo ácido de bactéria<sup>87</sup> foi o primeiro, cuja análise estrutural foi realizada pelo método de degradação. Uma suspensão do polissacarídeo na forma de seu hidroxipropil éster, obtido com metóxido de sódio metanólico contendo 2,2-dimetoxipropano como um agente desidratante, resultou na liberação de 4,6-O-(1-carboxietilideno)-D-galactose.

Todavia com um polissacarídeo insolúvel a reação causa somente 50% de degradação. A  $\beta$ -eliminação é melhor conduzida se a reação for efetuada usando-se um solvente não hidroxílico em polissacarídicos contendo substituintes estáveis à base, os quais podem ser permanentes, como por exemplo metil éter (O-metil) ou instáveis como por exemplo metoxietil acetais (O-acetil).

No método desenvolvido por HAKOMORI<sup>76,89,94</sup> que permite a permetilação do polissacarídeo, quando realizada em uma única etapa não ocorre a degradação. Contudo, no processo de remetilação que envolve a readição de base, esta pode propiciar a  $\beta$ -eliminação. Tratando-se o derivado parcialmente metilado com metil sulfinilmetamida de sódio (ion metil sulfinilcarbanion) em DMSO, há a liberação de substituintes 4-O-ligados e a formação de unidades de hex-4-enopiranosiluronato que poderão ser posteriormente degradadas. Esse processo desenvolvido por LINDBERG et alii é particularmente importante do ponto de vista quantitativo para polissacarídeos contendo somente unidades de açúcares neu-

tros não substituídos cuja análise é feita, após a conversão para acetato de alditóis parcialmente metilados por g.l.c.-m.s.

Na análise dos polissacarídeos capsulares de *Klebsiella* tipo 47<sup>91</sup>, os produtos da amostra metilada mostraram haver degradação durante o processo de metilação, onde as unidades de ramnopiranosose em posição terminal desapareciam, indicando que estas estavam presentes como unidades de ácido glucurônico 4-0-substituídas, e que foram perdidas por  $\beta$ -eliminação. Após alquilação dos polissacarídeos metilados degradados, ficou estabelecido que o 0-3 de unidades internas era o sítio de ligação de unidades de ácido urônico<sup>14</sup>

## 1.6 A PERESKIA ACULEATA (ora-pro-nobis)

Nos últimos anos tem-se observado um consumo crescente de polissacarídeos para fins de alimentação e usos industriais em geral. Todavia, observa-se também que a produção destes polímeros não tem acompanhado a sua demanda. Classificados pelo mercado mundial como especialidades químicas<sup>114</sup>, a maioria das macromoléculas na forma natural ou de seus derivados em nosso país é obtida através do serviço de importação, o que estimula a procura de fontes alternativas nacionais.

No Brasil inúmeras espécies nativas, são muito pouco conhecidas e utilizadas, tanto nos lares como nas indústrias. Entre elas situa-se o caso da cactácea *Pereskia aculeata* que passaremos a analisar.

Espécies do gênero *Pereskia* podem ser encontradas em

altitudes de até 4700m<sup>117</sup>. A *P. aculeata*, também conhecida como groselha da América, groselheira dos Barbados, groselheira das Antilhas, rosa Madeira e ora-pro-nobis<sup>39</sup>, é uma planta nativa da América Tropical e pode ser encontrada na África (Madagascar) e Ásia (Sri Lanka)<sup>15,48,59</sup>. No Brasil cresce desde a Bahia até o Rio Grande do Sul e, na medicina caseira, as folhas são utilizadas como emolientes, quando aplicadas sobre abscessos duros<sup>39</sup>. No meio rural, após a maceração do vegetal em água, o sumo mucilaginoso extraído de espécies congêneres e silvestres, misturado com cal é usado para branquear galpões e telhados de zinco<sup>48</sup>.

Segundo DAYRELL<sup>43,44</sup> a planta não é tóxica e suas folhas não apresentam fatores antinutricionais.

ALMEIDA FILHO e CAMBRAIA<sup>6</sup>, os primeiros a estudar seu valor nutritivo, verificaram que as folhas de ora-pro-nobis possuem elevado teor de proteínas (25,5%), este valor, em termos de matéria seca, é comparável ao do feijão (18-20%)<sup>57</sup> e superior ao milho híbrido comum (7,4%)<sup>140</sup> e mesmo ao opaco-2 (10,0%)<sup>40</sup>. O teor proteico é extraordinariamente elevado, quando comparado com vegetais onde a parte comestível são folhas de elevado teor em água como a couve, a alface e o espinafre, cujos teores proteicos são 1,6%, 1,3% e 2,2%, respectivamente. A análise de digestibilidade destas proteínas mostrou que em média 85% delas achava-se numa forma digerível. Observou-se que a ora-pro-nobis, mesmo sendo uma planta suculenta, possui um teor de lisina bastante elevado, (5,4g/100g de proteína). Isso em termos de matéria seca, seria de 2 a 23 vezes maior que em qualquer outro alimento acima considerado<sup>6</sup>. Esses resultados são bastan-



te significativos considerando-se a essencialidade da lisina na nutrição animal, e a carência desse aminoácido em muitos dos alimentos utilizados por classes de baixo poder aquisitivo.

A deficiência em lisina, comum nos cereais, é de considerável importância, pois três quartos da população mundial usam cereais e leguminosas para obter cerca de 80 a 90% do seu consumo de proteínas. A cada ano os cereais fornecem duas e meia vezes mais proteínas do que todos os alimentos de origem animal<sup>46,55,73</sup> e o valor nutritivo dos cereais consumidos pode ser enriquecido pelo acréscimo de vários ingredientes. Por exemplo, o macarrão feito apenas de semolina apresenta um valor proteico de 12%, em níveis limitantes dos aminoácidos essenciais: treonina, metionina e lisina<sup>121</sup>. Assim, não apresenta composição proteica adequada para o crescimento normal de crianças e para a manutenção corporal de adultos<sup>72</sup>. Devido a isso nos grandes centros consumidores, hoje existe no mercado um macarrão tipo especial, o macarrão verde (pasta verde), que tem boa aceitação entre as classes mais altas. Este macarrão, quando feito com espinafre, que dá sua cor esverdeada, tem um maior valor nutritivo por sua composição em sais minerais, especialmente ferro. Todavia sendo o produto caro, com a qualificação de luxo, não está ao alcance das classes mais pobres devido, principalmente, a baixa produção do espinafre e a sua não disponibilidade durante o ano todo.

Num trabalho efetuado por DEES<sup>46</sup> na Universidade de Vigosa na produção de macarrão verde as massas resultantes da adição de 1 e 2,5% de ora-pro-nobis obtiveram as maiores notas dentre os macarrões coloridos produzidos. Observaram, também, que a incorporação de até 2,5% de ora-pro-nobis em p $\tilde{o}$ , duplica

va a quantidade de fibra, o que foi nutricionalmente considerado positivo. A quantidade de fibra 7,6%<sup>44</sup> na matéria seca, segundo SCALA<sup>115</sup>, seria de grande interesse na indústria de alimentos processados, desde que uma das grandes preocupações médicas nos últimos dez anos é a falta de material celulósico nas dietas<sup>4,27,28,35,53,130</sup>, o que ocasiona a diminuição do peristaltismo intestinal, e conduz as chamadas doenças do mundo civilizado<sup>108</sup>. Foi descrito que o aumento no consumo de fibras pode tanto prevenir como diminuir e em alguns casos até curar doenças como: varizes<sup>111</sup>, câncer de cólon<sup>72</sup>, hemorróidas, tumores intestinais, cálculos renais<sup>98</sup>, diabetes<sup>99</sup>, além do que a sua presença pode, também, ser um fator dietético<sup>130</sup>.

Dos trabalhos efetuados até agora com as folhas de ora-pro-nobis pode-se relacionar a seguinte composição média na matéria seca: umidade 7,5%, gordura 3,5%, proteínas 19%, cálcio 2,5%, fósforo 0,5%, ferro 0,15%, magnésio 1,2%, fibra 7,5%, açúcares 40% e cinzas 18,0%<sup>6,43,44,122</sup>. Desses resultados foi sugerido que o aproveitamento das folhas de ora-pro-nobis, uma planta cultivada facilmente nos quintais e, de ciclo perene, em escala industrial poderia abrir nova fonte de renda para o pequeno produtor<sup>46</sup>.

A mucilagem de folhas de *Pereskia aculeata* que foi estudada inicialmente por SIERAKOWSKI<sup>123</sup>, apresentou-se constituída por um heteropolissacarídeo ácido, cuja complexidade estrutural motivou a continuidade dos estudos, originando o presente trabalho.

## 2. OBJETIVOS

O valor biológico dos polissacarídeos e a sua aplicação crescente nas áreas médicas e industriais é função da sua estrutura molecular. Considerando esses aspectos, os objetivos do presente trabalho sobre a proteoarabinogalactana acídica de folhas de *Pereskia aculeata*, são:

1. Determinar a constituição química;
2. Estudar a homo ou heterogeneidade;
3. Analisar a estrutura química e física por espectroscopia de ressonância nuclear magnética ( $^1\text{H}$ -n.m.r e  $^{13}\text{C}$ -n.m.r);
4. Determinar a estrutura química parcial através das análises de metilação (g.l.c. e g.l.c.-m.s);
5. Caracterizar a ligação glicosil-aminoácido;
6. Estudar a susceptibilidade a  $\beta$ -eliminação, quando submetida a tratamento alcalino;
7. Estudar a distribuição de grupos O-acetílicos;
8. Verificar o comportamento físico-químico em termos de viscosidade.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

Os reagentes e solventes utilizados apresentavam características PA-ACS. O etanol empregado na precipitação dos polissacarídeos e a acetona para a sua secagem apresentavam a especificação "técnica".

As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório, à vácuo, a temperatura de 50<sup>o</sup> e no caso dos éteres das amostras metiladas a 20-30<sup>o</sup>.

As leituras e o ajustamento do índice de pH foram feitas a temperaturas ambiente em aparelho Micronal.

A eletroforese, para a verificação da homo ou heterogeneidade, foi feita em fitas de acetato de celulose (Celogel) após coloração da amostra com Azul de Procion M-3G (Cia Imperial de Indústrias Químicas do Brasil), pelo método de DUDMAN e BISHOP<sup>48</sup> utilizando-se o aparelho Fanen, 250-350V, 7 mA, 10 min, com câmara de imersão da Chemetron e tampão borato 0,2 M, pH 9,2.

As rotações específicas foram obtidas em polarímetro automático Perkin-Elmer, modelo 141 a 25<sup>o</sup>. Para essas determinações as amostras foram solubilizadas em água com as seguintes concentrações em açúcar total: 0,15% (polissacarídeo P); 0,195%

(F-2); 0,22% (F-3); 0,11% (F-7) e 0,2% (polissacarídeo P-1) (Tabela II).

As determinações espectrofotométricas foram efetuadas em:

- a) Aparelho Coleman Júnior, modelo 6A, para a região visível;
- b) Aparelho Beckman Acculab<sup>TM</sup>10, em disco de KBr ou filme de  $\text{CHCl}_3$  sobre célula de KBr, para a região do infra-vermelho;
- c) Aparelho Varian, UV-VIS, modelo 635 e Intralab DMS 80, UV-VIS.

As análises cromatográficas em papel (c.p) foram realizadas pela técnica ascendente, utilizando-se o sistema de solventes benzeno-n-butanol-piridina-água (1:5:3:3 v/v, fase superior) e como revelador usou-se nitrato de prata alcalino<sup>137</sup>. As análises cromatográficas em camada delgada (t.l.c.) foram realizadas em placas (20 x 20 cm) de sílica gel, em suporte de alumínio (Merck), com 0,25 mm de espessura, empregando-se, os seguintes sistemas de solventes e visualizadores, respectivamente:

- a) n-Butanol-acetona-tampão fosfato pH 5 (4:5:2, v/v) e placa tamponada no mesmo tampão; visualizador: fosfato de anilina<sup>71</sup>.
- b) Solução aquosa de fenol a 75% (v/v); visualizador: ninhidrina a 0,1% em acetona (p/v)<sup>47</sup>.

As cromatografias líquido-gasosas (g.l.c.) foram realizadas em cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama, utilizando-se nitrogênio como gás de arraste e as seguintes colunas:

A) 3% de ECNSS sobre "gas chrom Q" de 100-120 mesh, em tubo de aço inoxidável 200 x 0,15 cm (d.i.), com detetor a 240<sup>0</sup>, injetor a 190<sup>0</sup> e fluxo de nitrogênio a 37,5 mL/min. A temperatura da coluna para os produtos de hidrólise na forma de acetato de alditóis era de 175<sup>0</sup> e, para a análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, de 150<sup>0</sup><sup>89</sup>.

B) 3% de OV-225 sobre gás Chrom Q de 100-200 mesh, em tubo de aço inoxidável 200 x 0,15 cm (d.i.) com detetor a 240<sup>0</sup>, injetor a 190<sup>0</sup> e fluxo de nitrogênio a 40,0 mL/min. A temperatura de operação da coluna para os produtos de hidrólise na forma de acetato de alditóis era 190<sup>0</sup> e, para a análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, 165<sup>0</sup>.

C) Chromosorb 101, 50-60 mesh, temperatura de 120<sup>0</sup>.

D) Porapak Q, temperatura 120<sup>0</sup>.

Os tempos de retenção (T) foram determinados relativos ao xilitol penta-acetato para os derivados totalmente acetilados, e 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, para os derivados acetilados parcialmente metilados. As determinações quantitativas dos produtos analisados por g.l.c foram obtidos de acordo com o método de triângulação, segundo SAWARDEKER et alii<sup>133</sup>.

A cromatografia líquida-gasosa acoplada a espectrometria de massa (g.l.c.-m.s) foi realizada com os derivados acetatos de alditóis parcialmente metilados em espectrometro Finnigan, modelo 4000, dotado de um sistema de dados Incos 2300 e equipado com coluna capilar (30 m x 0,25 mm d.i.) revestida com:

E) OV-225 e OV-17 na proporção de 3:1<sup>17,63</sup>

F) DB-210 e

G) OV-225.

Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons, repetitivamente a cada 2 segundos a 70 eV desde massa 40 até 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50°, utilizando a técnica "split"<sup>66</sup> e, o aparelho foi rapidamente programado para 40°/min até 182° (então mantido) para a coluna E e G, a 40°/min até 195° (então mantido) para a coluna F. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 35 cm/s. A identificação final dos produtos foi realizada por co-injeção com padrões e por típicos tempos de retenção<sup>76</sup>. As áreas dos picos foram obtidas por integração automática e/ou triangulação.

Para as espectroscopias de ressonância nuclear magnética de próton (<sup>1</sup>H-n.m.r.) as amostras (40-100 mg) foram dissolvidas em D<sub>2</sub>O e os espectros obtidos em espectrômetro Jeol J. NM-PMx60. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referidos ao Me<sub>4</sub>Si (TMS) contido num capilar coaxial ao tubo de amostra. As frações F-2, F-3 foram analisadas sob pré-saturação para remoção do pico de DOH.

Os espectros de ressonância nuclear magnética de carbono-13 (<sup>13</sup>C-n.m.r) foram obtidos com o uso dos seguintes espectrômetros incorporados ao transformador Fourier:

a) Varian XL-100-15; soluções de 40-100 mg em 0,85 mL de D<sub>2</sub>O contidas num cilindro coaxial colocadas em tubo de 1,2 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento mantidas a 70°. O "spectral width" (s.w.) 5000 Hz, o "acquisition time" (a.q.) 0,4 s, o "pulse width" (p.w.) 9,5  $\mu$ s, e o "number of transients" (n.s.) 69080.

b) Bruker AM-360-WB; soluções de 60 mg do polisacarídeo P em 2 mL de DMSO- $^2\text{H}_6$  e 18 mg do polissacarídeo P-1 em 2 mL de  $\text{D}_2\text{O}$  foram colocadas em um tubo de 1 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento e mantidas a  $33^\circ$ , para serem analisadas no espectrofotômetro, onde os deslocamentos químicos obtidos a  $33^\circ$  foram corrigidos para +1.0 p.p.m para a temperatura de  $70^\circ$  usando o aparelho de 100 MHz. Os parâmetros espectrais foram: "s. w. 18519 Hz, a.q. 0,44 s, p.w. 21  $\mu\text{s}$  e n.s. respectivamente 88496 e 79488, dependendo da quantidade da amostra utilizada. Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (p.p.m.) relativos à ressonância do TMS, determinada em experimento separado.

As liosofilizações das soluções foram feitas em aparelho Virtis, modelo 10-145 MR-DA.

As dosagens de carboidrato total foram realizadas pelo método fenol-ácido sulfúrico<sup>51</sup> a 490 nm utilizando-se como padrão solução de D-glucose a 40  $\mu\text{g/mL}$ ; ácidos urônicos pelo método de BITTER e MUIR<sup>24</sup> usando-se ácido D-galacturônico como padrão (11,40  $\mu\text{g/mL}$ ) e o fator de correção 0,75<sup>49</sup>; O-acetil pelo método de HESTRIN<sup>69</sup>, utilizando-se um padrão de glucose penta-acetato (3  $\mu\text{moles/mL}$ ); nitrogênio total (N) pelo método de micro KJELDAHL<sup>80</sup>; proteínas (N x 6,25); hexosaminas pelo método de DISCHE<sup>50</sup>, utilizando-se um padrão de glucosamina (15  $\mu\text{g/mL}$ ); fósforo pelo método de BARTLETT<sup>19</sup> com fosfato monobásico de sódio (36,2  $\mu\text{g/mL}$ ) como padrão; cálcio pelo método de CLARK e COLLIP<sup>34</sup>; metoxil segundo o método de SCHULTZ<sup>116</sup>; umidade em estufa a  $100-110^\circ$ <sup>127</sup>.



### 3.1.1 HIDRÓLISES

#### 3.1.1.1 Hidrólises alcalinas para a liberação dos substituintes acetil e metoxil.

As amostras do polissacarídeo P foram tratadas com solução aquosa 1,0 M de NaOH, a temperatura ambiente, durante 12 horas. A seguir dializadas (2x) contra água deionizada (12 h), em sistema fechado. A fração dializável foi concentrada para volume menor, deionizada com resina Dowex 50W X8 (forma H<sup>+</sup>), e filtrada. O filtrado aquoso foi extraído exhaustivamente com éter etílico e a fase etérea analisada por g.l.c., na coluna C, utilizando-se um padrão de ácido acético como referência.

Em outro experimento as amostras foram tratadas, durante 1 hora a temperatura ambiente com solução aquosa de NaOH 1,0 M. O hidrolisado foi aplicado em uma micro coluna de resina Dowex 50W X8 (forma H<sup>+</sup>) e eluído com H<sub>2</sub>O deionizada. O eluato aquoso foi analisado por g.l.c. na coluna D, utilizando um padrão de MeOH como referência.

#### 3.1.1.2 Hidrólises ácidas

**Hidrólises totais** - As hidrólises totais foram feitas em tubo KIMAX, com os seguintes ácidos e concentrações:

- a) ácido trifluoracético (TFA) 1,0 M, durante 5 h a 100°;
- b) ácido sulfúrico a 72% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), durante 1 h a

frio seguido de diluição para 8% e aquecimento durante 4 ou 18 horas em banho de água fervente, dependendo do tipo de amostra a ser hidrolisada;

- c) ácido clorídrico (HCl) 6,0 M, em estufa a 105°, durante 18 horas.

**Hidrólises parciais** - As hidrólises parciais foram realizadas em tubos KIMAX, com TFA 0,02 M, durante 2 horas em banho de água fervente.

Os excessos de TFA e HCl foram removidos por sucessivas evaporações a vácuo das soluções hidrolisadas, e o de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por meio de neutralização com carbonato de bário. O material insolúvel foi removido por filtração.

### 3.1.2 REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS OBTIDOS NAS HIDRÓLISES ÁCIDAS TOTAIS DAS AMOSTRAS.

As amostras foram reduzidas com NaBH<sub>4</sub><sup>120</sup> a temperatura ambiente, por 16 horas e, em seguida tratadas com resina Dowex 50W X8, forma H<sup>+</sup>, para eliminar os íons de sódio. Após filtração, as soluções foram concentradas sob pressão reduzida, a 45°. O ácido bórico foi eliminado por codestilação com metanol na forma do ester volátil borato de trimetila. Os alditóis resultantes foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v)<sup>141</sup>, a temperatura ambiente, durante 16 horas, quando o processo foi interrompido pela adição de gelo moído. Os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio, a piridina residual foi eliminada da preparação por tratamentos sucessivos

com  $\text{CuSO}_4$  2,5% e a solução clorofôrmica lavada várias vezes com água destilada. Após a evaporação do excesso do solvente, os acetatos de alditóis foram analisados por g.l.c., colunas A e B, nas condições já descritas anteriormente.

### 3.1.3 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO P

#### 3.1.3.1 Preparo do pó acetônico

Folhas verdes de *Pereskia aculeata* ( $\approx 590$  g) coletadas em março de 1982, no município de Viçosa, Minas Gerais, foram imersas em etanol, durante 72 horas, filtradas e o sobrenadante etanólico desprezado. As folhas foram secas ao ar ( $\approx 93$  g) e, em seguida, mergulhadas em acetona por 48 horas. Após filtração e secagem em capela, as folhas foram trituradas em Moinho Wiley, utilizando-se uma peneira de 20 mesh. O pó acetônico obtido foi, a seguir, extraído em extrator Soxhlet usando uma mistura de benzeno-etanol (2:1, v/v), por 24 horas. O extrato resultante foi desprezado. O pó residual ( $\approx 90$  g) serviu para o processo de extração do polissacarídeo bem como para a determinação da umidade.

#### 3.1.3.2 Extração do polissacarídeo com água

O pó extraído com benzeno-etanol (86,5 g) foi submetido ao processo de extração com água ( $\approx 900$  mL) a  $50^\circ$ , sob agitação durante 24 horas. O sobrenadante viscoso foi isolado por centrifugação a 8000 r.p.m., durante 15 min, a temperatura ambi-

ente. O precipitado foi novamente submetido a mais duas extrações, como descrito acima, e os sobrenadantes foram reunidos (2,3 L) e, então, dialisados em água corrente, durante 24 horas. Ao material dialisado (pH 4,7) acrescentou-se solução aquosa de NaOH, 0,1 M para corrigir o pH a 7,0. A seguir, adicionou-se lentamente e sob agitação solução aquosa de brometo de cetiltri metilamônio a 1% (Cetavlon), levando-se em conta as quantidades do polissacarídeo e do detergente<sup>118,119</sup>. O sobrenadante e o complexo insolúvel polissacarídeo-detergente foram separados por centrifugação. O sobrenadante foi desprezado após a verificação da ausência de carboidrato pela dosagem de açúcar total<sup>51</sup>. O precipitado foi dissolvido em ácido acético a 10%, reprecipitado com etanol (3 volumes) e lavado sequencialmente com etanol e acetona. Após secagem em aparelho de ABDERHALDEN, obteve-se 10,20 g de pō total, denominado de componente P (Esquema 1 página 55).

### 3.1.3.3 Desproteínoização segundo SEVAG<sup>131</sup>

Aproximadamente 8,0 g do componente P em solução aquosa (= 100 mL) foram desproteínoizados com a mistura de SEVAG<sup>131</sup>, durante 18 horas, a temperatura ambiente. O processo foi repetido mais 6 vezes. Após a desproteínoização a amostra foi precipitada com etanol (3 volumes). O precipitado foi lavado sucessivamente com etanol e acetona e seco à vácuo em aparelho de ABDERHALDEN, obtendo-se aproximadamente 7,0 g de pō seco denominado de polissacarídeo P que foi submetido às análises químicas e espectroscópicas.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS ESPECIAIS

### 3.2.1 FILTRAÇÕES EM GÉIS<sup>32</sup>

#### 3.2.1.1 Filtração em Gel de Sephadex G 200

Uma amostra do polissacarídeo P (50 mg) foi colorida com azul de Procion M-3G, segundo o método de DUDMAN e BISHOP<sup>52</sup>. O polissacarídeo colorido foi então aplicado em uma coluna (40,0 x 2,0 cm, d.i.), contendo Sephadex G 200 e eluído com água destilada, observando-se o aparecimento de três bandas durante a eluição.

#### 3.2.1.2 Filtração em Gel de Sepharose 6B

O polissacarídeo P (45 mg) foi dissolvido em 0,5 mL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,2 e aplicado em uma coluna de vidro (40,0 x 2,0 d.i.) contendo Sepharose 6B, calibrada com Blue Dextran e eluída com o mesmo tampão. Frações de 2,5 mL foram coletadas a temperatura ambiente, com coletor automático de frações. Dosagens de açúcar total<sup>51</sup> foram realizadas em cada alíquota e o perfil de eluição encontra-se na Figura 2.

#### 3.2.1.3 Filtração em Bio-Gel A5 M

Uma coluna de vidro (45 cm x 2 cm, d.i.) foi empacotada com uma suspensão de Bio-Gel A5 M em tampão fosfato 0,1 M, pH

8,0, e calibrada com Blue Dextran. Na superfície do gel foi aplicada uma solução do polissacarídeo original P (43 mg em 0,3 mL de tampão) que foi eluída com o mesmo tampão. Volumes de 2,5 mL foram coletados a temperatura ambiente e monitorados a 280 nm (proteínas) e a 490 nm (açúcar total). Figura 1.

### 3.2.2 FRACIONAMENTO DO POLISSACARÍDEO P EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE, FORMA $\text{Cl}^-$ .

Aproximadamente 1,5 g do polissacarídeo P foi dissolvido em água (100 mL) e a solução foi aplicada no topo de uma coluna (24,0 x 4,0 cm, d.i.) contendo DEAE-celulose (forma  $\text{Cl}^-$ ). A coluna foi eluída com água (310 mL) até apresentar reação negativa para açúcar total<sup>51</sup>. A solução aquosa foi concentrada a um volume reduzido e precipitada com EtOH (3 volumes). O precipitado obtido foi separado por centrifugação, lavado sequencialmente com etanol e acetona e secado a vácuo, originando a fração denominada F-1.

A seguir a coluna, foi consecutivamente eluída com soluções de NaCl 0,1 M (1074 mL), NaCl 0,25 M (1150 mL), NaCl 0,5 M (180 mL), NaCl 0,75 M (110 mL), NaCl 1,0 M (104 mL), HCl 0,1 M (1685 mL) e HCl 0,25 M (765 mL). Os eluatos foram dialisados, concentrados a um volume reduzido e precipitados com etanol (3 volumes), originando-se as frações F-2, F-3, F-4, F-5, F-6, F-7 e F-8, respectivamente. Os resultados das análises efetuadas, encontram-se na Tabela III.

Alíquotas das amostras F-2, F-3 e F-7 (15 mg), que compreendem as frações percentualmente majoritárias do polissacarídeo P,

foram analisadas na forma de acetatos de alditóis conforme metodologia já descrita. Os produtos obtidos foram examinados por g.l.c. nas colunas A e B, cujos resultados podem ser vistos na Tabela II.

### 3.2.3 ANÁLISES DE METILAÇÃO

#### 3.2.3.1 Análise de metilação das frações F-2 e F-3

##### Método de HAWORTH<sup>68,70</sup>

Amostras das duas frações, F-2 e F-3 (31 mg de açúcar total), foram dissolvidas em 10 mL de solução aquosa de NaOH a 40%, contendo NaBH<sub>4</sub>. As soluções, a temperatura ambiente, foram agitadas sob atmosfera de nitrogênio durante 2 horas. Após, adicionou-se acetona (3 mL) e sulfato de dimetila (3,5 mL). Esse último reagente foi adicionado, gota a gota, ao longo de 12 horas e os processos permaneceram em agitação por mais 8 h. Após esse período as misturas metilantes foram neutralizadas com ácido acético concentrado, gota a gota, em banho de gelo, utilizando-se fenolftaleína como indicador. As frações parcialmente metiladas foram dialisadas em água corrente (25 h) e o processo de metilação foi repetido mais uma vez.

##### Método de KUHN et alii<sup>85</sup>

Após secagem dos polissacarídeos parcialmente metilados pelo método de HAWORTH às amostras adicionou-se N, N-dimetilformamida (2 mL). As suspensões foram agitadas por 2 horas a frio e, posteriormente, em banho-maria (98<sup>0</sup>) por 30 min. Depois dos materiais estarem totalmente solubilizados, foi adicionado iodeto de

metila (2 mL) e rapidamente óxido de prata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ; 0,2 g) de acordo com o método descrito por PURDIE e modificado por KUHN et alii<sup>70,85</sup>. Nos quatro dias consecutivos foram adicionados  $\text{Ag}_2\text{O}$  (0,2 g por dia) e os sistemas mantidos sempre sob agitação e na ausência de luz. Vinte e quatro horas após a última adição de  $\text{Ag}_2\text{O}$  os processos foram interrompidos e extraídos exaustivamente com diclorometano, seguido da filtração em funil de placa porosa F. O solvente foi evaporado até a secura e os materiais colocados em dessecador (12 h). Como a análise por I.V. indicou, ainda, fraca absorção acima de 3200 nm, o processo de metilação pelo método de KUHN et alii foi repetido mais uma vez. Os produtos metilados foram hidrolisados, reduzidos e acetilados da mesma maneira como descrito no item 3.2.3.4 de MATERIAIS E MÉTODOS.

### 3.2.3.2 Análise de metilação do Polissacarídeo P

O polissacarídeo P (310 mg de açúcar total) foi metilado sucessivamente pelo método de HAWORTH<sup>68</sup> (2 vezes) e de KUHN et alii<sup>85</sup> (2 vezes).

Em seguida o polissacarídeo metilado foi dissolvido em clorofórmio e dividido em duas alíquotas iguais. Uma delas foi hidrolizada para a posterior conversão do polissacarídeo metilado em acetato de alditóis parcialmente metilado (item 3.2.3.4), enquanto a segunda foi utilizada para o processo de carboxi-redução das unidades de ácido urônico<sup>95</sup>.



### 3.2.3.3 Carboxi-redução do polissacarídeo P me tilado<sup>95</sup>

O polissacarídeo metilado e seco foi dissolvido em tetrahydrofurano (15 mL) e a solução foi gotejada lentamente, sobre uma suspensão de  $AlLiH_4$  no mesmo solvente (15 mL). Após 24 h de reação o THF foi evaporado e o produto extraído e exaustivamente com clorofórmio. O polissacarídeo metilado e carboxi-reduzido foi dividido em duas alíquotas iguais. Uma foi tratada conforme o item 3.2.3.4. e a outra foi secada para efetuar-se o processo de permetilação pelo método de HAKOMORI<sup>67</sup> modificado por SANDFORD e CONRAD<sup>113</sup>. Para isso, o material foi dissolvido em DMSO (2,5 mL) e tratado com metilsulfinil carbanion (0,7 mL), em atmosfera de nitrogênio, sob constante agitação, a temperatura ambiente, durante 12 horas. Formado o alcóxido, o iodeto de metila (1,0 mL) foi gotejado lentamente, sob agitação, e sob banho de gelo. Após 12 horas, adicionou-se água à mistura reativa e fez-se a extração com clorofórmio. Após extração exaustiva o material metilado carboxi-reduzido e permetilado foi concentrado à secura e hidrolizado pelo método de SELVENDRAN<sup>120</sup>.

### 3.2.3.4 Análise dos produtos de hidrólise ácida:

- a) Das frações F-2 e F-3 metiladas;
- b) Do polissacarídeo:

- 1) Metilado (P);
- 2) Metilado e carboxi-reduzido (P<sup>0</sup>);

3) Metilado, carboxi-reduzido e permetilado (P<sup>®</sup>).

As amostras contidas em tubos KIMAX foi adicionado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aquoso (0,75 mL) a 72%, sob banho de gelo, e agitadas até total solubilização. Após 1 hora foram acrescentados 6 mL de H<sub>2</sub>O destilada, para diluir o ácido até 0,5 M<sup>120</sup>. Os tubos foram colocados em estufa a 100<sup>0</sup> por 18 h. O excesso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi neutralizado com BaCO<sub>3</sub> e o filtrado deionizado através de resina DOWEX 50W X8 (forma H<sup>+</sup>). A seguir as amostras foram reduzidas com NaBH<sub>4</sub> a temperatura ambiente, durante 14 horas. Os íons de sódio foram removidos pelo tratamento com resina DOWEX 50W X8 (forma H<sup>+</sup>) e o ácido bórico eliminado sob a forma de borato de trimetila, por co-destilação com metanol. A acetilação dos alditóis metilados foi realizada pela adição de anidrido acético-piridina 1:1 (2,0 mL). Os produtos metilados, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados, foram analisados por g.l.c. nas colunas A e B por g.l.c.-m.s nas colunas E(F-2 e F-3); e E e G (P, P<sup>0</sup>, P<sup>•</sup>). Resultados na Tabela IV(F-2 e F-3) e V(P, P<sup>0</sup>, P<sup>•</sup>).

## 3.2.4 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO

## P, OBTENÇÃO DE P-1

O polissacarídeo P (235 mg) foi dissolvido em solução aquosa de TFA, 0,02 M (10 mL) e colocado a 100<sup>0</sup>C, sob refluxo, durante 2 horas. A seguir, adicionou-se EtOH (4 volumes) e o material precipitado foi centrifugado, lavado sucessivamente com etanol e acetona. Após secagem a vácuo, o produto denominado de P-1 pesou 115 mg. Tanto o sobrenadante alcóólico (S-1) como o precipitado (P-1) foram analisados por g.l.c. na forma de aceta

tos de alditóis nas colunas A e B, conforme a descrição dos materiais e métodos gerais (Resultados, Tabela II).

O polissacarídeo P-1 foi, também, analisado após sucessivas metilações pelos métodos de HAWORTH<sup>68</sup> (2 vezes) e KUHN et alii<sup>85</sup> (2 vezes), por g.l.c.-m.s. na coluna E (resultados na Tabela V).

### 3.2.5 TRATAMENTO DO POLISSACARÍDEO P-1 COM GALACTOSE OXIDASE.

Uma amostra do polissacarídeo P-1, contendo ~8 mg de açúcar total, foi hidrolizada com TFA (1 M, 5 h, 100<sup>o</sup>) e o excesso de ácido foi removido após sucessivas evaporações a vácuo. O hidrolisado foi aplicado em uma micro coluna de resina mista (MB-3, 20-50 mesh, forma H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup>) e eluído com água deionizada. O eluato aquoso foi utilizado inicialmente para dosagem do açúcar total (3,0 mg/1 mL) e, posteriormente, como substrato para a enzima, bem como para análise por g.l.c (coluna B) como acetato de alditóis (80% D-Gal).

A atividade da galactose oxidase, extracelular, foi determinada pela dosagem do peróxido de hidrogênio formado pelo método enzimático acoplado de AISAKA e TERADA<sup>1</sup>. A decomposição da água oxigenada formada, em presença de peroxidase, neste método acopla oxidativamente a 4-aminoantipirina ao fenol, resultando num produto colorido, a quinoneímina, que apresenta absorção máxima a 500 nm<sup>5</sup>.

O sistema de incubação, em um volume de 3 mL, continha 45 µmoles de tampão fosfato pH 7,0; 1,5 µmoles de 4-aminoantipirina; 21 µmoles de fenol; 20 unidades de peroxidase; 50 µL

de enzima (4 µg de galactose oxidase extracelular com atividade específica de 3,30 unidades/mg e 100 µL de substrato.

A reação foi sempre iniciada pela adição de enzima. Após incubação a 30<sup>o</sup> por 60 min a coloração desenvolvida foi lida a 500 nm. A conversão das unidades de absorbância da amostra (0,24) em µg de D-galactose, foi realizada pela relação direta com um padrão específico (concentração 90 µg, absorbância igual a 0,2). Todos os controles sem enzima e sem substrato foram efetuados na determinação da concentração de D-Gal presente no ensaio, no qual não foi observado o desenvolvimento de produto colorido.

### 3.2.6 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS (FA).

O polissacarídeo P (50 mg) foi hidrolisado com solução aquosa TFA 1 M (7 mL) em banho de água fervente, durante 5 horas. Após a remoção do excesso de ácido o produto hidrolisado foi aplicado em uma coluna (15 x 2,0 cm, d.i.) contendo resina AG1 - X10 (200-400 mesh, forma AcO<sup>-</sup>). Os açúcares neutros foram eluídos com água (30 mg), enquanto a fração ácida, denominada de FA (13 mg) foi removida com solução aquosa de ácido acético a 30%. A fração FA foi então, metilada pelos métodos de HAWORTH<sup>68</sup> (2 vezes) e pelo método de KUHN et alii<sup>85</sup> (2 vezes). A amostra FA metilada foi carboxi-reduzida com LiAlH<sub>4</sub> conforme descrito para o polissacarídeo P (item 3.2.3.3), remetilada pelo método de KUHN et alii e analisada na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados nas colunas A e B con

forme descrito no item 3.2.3.4 (resultados na Tabela V).

### 3.2.7 ANÁLISES POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA.

As amostras foram analisadas por espectroscopia de ressonância nuclear magnética de próton e de carbono treze <sup>62,106</sup>, conforme descrito nos materiais e métodos gerais, cujos espectros podem ser vistos nas Figuras:

4A-4C (<sup>1</sup>H-n.m.r das frações F-2, F-3 e F-7);

5 (<sup>1</sup>H-n.m.r do polissacarídeo P);

6A-6C (<sup>13</sup>C-n.m.r das frações F-2, F-3 e F-7);

7A-7B (<sup>13</sup>C-n.m.r do polissacarídeo P);

7C (<sup>13</sup>C-n.m.r do polissacarídeo P-1);

9 (<sup>13</sup>C-n.m.r do polissacarídeo P degradado, P<sub>β</sub>).

### 3.2.8 ANÁLISE DA LIGAÇÃO AÇÚCAR-PROTEÍNA NO POLISSACARÍDEO P <sup>88</sup>.

À 160 mg do polissacarídeo P, foi adicionado solução aquosa saturada de Ba(OH)<sub>2</sub> (6 mL) e NaBH<sub>4</sub> (20 mg) e a mistura foi aquecida em banho de água fervente durante 13 horas. Após a neutralização com solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M e remoção do precipitado por centrifugação, o sobrenadante foi concentrado (2 mL) e dividido em duas alíquotas iguais. À primeira adicionou-se NaBH<sub>4</sub> (10 mg) e solução aquosa de NaOH 0,5 M (6 mL). A mistura foi em seguida aquecida em banho de água fervente durante 5 ho

ras. Após a hidrólise alcalina o material foi deionizado em resina Dowex 50W X8 (forma H<sup>+</sup>), filtrado, concentrado e desboratado por co-destilação com metanol. O produto residual foi hidrolisado com TFA 1 M (1 mL) durante 5 horas. Após evaporação do excesso de TFA, a amostra foi acetilada com anidrido-acético: piridina, 1:1 (1 mL), extraída com clorofórmio e analisada por g.l.c.-m.s. na coluna F. (Resultado, Figura 8A).

A segunda alíquota (1 mL) proveniente da degradação alcalina foi concentrada até a secura e hidrolisada com HCl 6 M (1 ml) em estufa, durante 18 h. Após a remoção do excesso de ácido, o material foi cromatografado em placa de sílica gel G-60 (Merck) usando-se o solvente e o visualizador b, conforme descrito nos MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS (item 3.1). Resultado na Figura 8B.

### 3.2.9 PROCESSO DE $\beta$ -ELIMINAÇÃO DO POLISSACARÍDEO P, COM LÍTIU EM ETILENODIAMINA<sup>101,102</sup>

A  $\beta$ -eliminação do polissacarídeo P (260 mg) isento de umidade, foi efetuada, dissolvendo-se a amostra (30 mL) em etilenodiamina e deixando-se sob agitação durante (1 hora). A seguir, pequenos pedaços de lítio metálico foram adicionados até aparecer coloração azul. A reação foi mantida a 20<sup>0</sup>, sob atmosfera de argônio, durante aproximadamente 3 horas, com eventual adição de lítio metálico, mantendo-se a coloração azul. A reação foi interrompida pela adição de metanol seco, ocorrendo o desaparecimento da coloração. A etilenodiamina em excesso foi removida por concentração a vácuo e o resíduo amarelo foi dissolvido em água (35 mL).

O pH dessa solução foi corrigido para 7,0, com ácido acético concentrado. Após diálise primeiramente em água corrente e a seguir em água deionizada, o material foi concentrado até a secura, colocado em dessecador (24 horas) e pesado (92 mg). Uma alíquota da amostra degradada denominada P<sub>6</sub> (10 mg) foi hidrolisada e os produtos analisados na forma de acetato de alditóis, nas colunas A e B (Tabela II).

### 3.3 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS O-ACETÍLICOS NO POLISSACARÍDEO P.

A quantificação dos grupos O-acetílicos foi feita pelo método de HESTRIN<sup>69</sup> e pela análise do ácido acético liberado após a hidrólise alcalina, com solução aquosa de NaOH 1,0 M (item 3.1.1.1 de MATERIAIS E MÉTODOS).

A localização dos grupos O-acetílicos no polissacarídeo P, foi feita pelos métodos:

- 1) de BOUVENG<sup>25</sup> modificado por CORRÊA et alii<sup>38</sup>;
- 2) Usando-se DMSO como solvente, metóxido de sódio metanólico como agente desacetilante e CD<sub>3</sub>I como substituinte de grupos O-acetílicos.

### 3.3.1 LOCALIZAÇÃO DOS GRUPOS O-ACETÍLICOS PELO MÉTODO DE BOUVENG<sup>25</sup> MODIFICADO POR CORRÊA et alii<sup>38</sup>.

#### Tratamento do polissacarídeo com fenilisocianato

Uma alíquota do polissacarídeo P (120 mg), secada com aparelho de ABDERHALDEN foi dissolvida em piridina anidra (10 mL) e tratada com fenilisocianato (0,8 mL) durante 12 horas a 50°<sup>20</sup>. O polissacarídeo foi precipitado com EtOH, centrifugado, lavado 3 vezes com o mesmo solvente, secado a vácuo sob atmosfera de pentóxido de fósforo e submetido a um segundo tratamento com fenilisocianato, nas mesmas condições. O derivado fenilcarbamato foi analisado, por UV, IV e <sup>1</sup>H-n.m.r.

#### Metilação e desacetilação

A amostra derivada foi dissolvida em tetrahydrofurano anidro (5 mL) contendo NaOH pulverizado e seco (1 g). Manteve-se o sistema sob agitação e, adicionou-se dimetil sulfato (1 ml) gota a gota. Posteriormente, após 15 horas a temperatura ambiente, o sistema foi resfriado em banho de gelo, e o excesso de NaOH neutralizado com solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M, usando fenolftaleína como indicador. A seguir, removeu-se o tetrahydrofurano por destilação, e extraíu-se o derivado fenilcarbamoilado metilado com clorofórmio. A solução clorofórmica foi tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e o solvente evaporado. Colocou-se o material em presença de pentóxido de fósforo e todo o processo repetiu-se mais uma vez.



### Remoção dos grupos fenilcarbamoilas

A amostra fenilcarbamato metilada foi dissolvida em DMSO (5 mL) e tratada com NaH. A reação permaneceu sob agitação durante 16 horas. O excesso de íon metil sulfinil, formado no meio, foi decomposto pela adição de água e o polissacarídeo parcialmente metilado foi precipitado com etanol (3 volumes), centrifugado, lavado sucessivamente com etanol acetona e secado.

### Hidrólise redução e acetilação do derivado parcialmente metilado.

Os processos foram realizados conforme descrito no item 3.2.3.4 de MATERIAIS E MÉTODOS.

Os derivados na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por g.l.c. nas colunas A e B e por g.l.c.-m.s nas colunas capilares E e F, resultados na Tabela VII.

### 3.3.2 LOCALIZAÇÃO DOS GRUPOS O-ACETÍLICOS USANDO-SE DMSO COMO SOLVENTE, METÓXIDO DE SÓDIO METANÓLICO COMO AGENTE DESACETILANTE E $CD_3I$ COMO SUBSTITUINTE DE GRUPOS O-ACETÍLICOS.

Outra amostra de polissacarídeo P (160 mg) foi dissolvida em DMSO (7,5 mL) e, deixado sob agitação durante 3 horas. A seguir adicionou-se fenilisocianato (1 mL) e colocou-se o material em estufa a  $50^{\circ}$ , durante 24 horas<sup>20</sup>. O polissacarídeo fenil-

carbamoilado foi precipitado com etanol (3 volumes), centrifugado, lavado com etanol e acetona e o precipitado colocou-se em aparelho de ABDERHALDEN para secar. Todo o procedimento repetiu-se mais uma vez.

### Desacetilação e metilação do derivado fenilcarbamoilado.

A amostra fenilcarbamoilada foi dissolvida em tetraidrofurano anidro (4 mL). A seguir adicionou-se solução de metóxido de sódio metanólico 0,1 M (2 mL). O sistema permaneceu durante 4 horas sob refluxo e foi neutralizado com ácido acético. Evaporou-se o tetraidrofurano e a amostra foi colocada em dessecador (12 horas). Após esse período solubilizou-se em DMF (4 mL) e a amostra foi dividida em dois volumes iguais. A um deles adicionou-se "molecular sieve", 4Å, (0,2 g), Ag<sub>2</sub>O (1 g) e CD<sub>3</sub>I (2 mL) mantendo-se o meio de reação a 4<sup>o</sup>. O processo manteve-se sob agitação suave na ausência de luz durante 24 horas. No dois dias seguintes adicionou-se Ag<sub>2</sub>O (1 g) a cada dia. Vinte e quatro horas após a última adição de Ag<sub>2</sub>O, interrompeu-se a reação pela extração exaustiva com diclorometano, seguida de filtração em funil de placa porosa F. O filtrado foi evaporado até a secura e colocado em dessecador (12 h).

### Remoção dos grupos fenilcarbamoilas e remetilação

O produto fenilcarbamoilado metilado com CD<sub>3</sub>I foi dissolvido em DMSO (4mL) e tratado com NaH. O sistema foi manti-

do durante 24 horas. Após esse período decompos-se o excesso de íon pela adição de água; o meio foi neutralizado com ácido acético e o polissacarídeo metilado foi precipitado com EtOH (3 volumes), centrifugado, lavado sucessivamente com etanol e acetona e colocado em dessecador (12 h). A amostra foi, então, remetilada pelo mesmo processo anteriormente descrito, somente substituindo-se o  $CD_3I$  por  $CH_3I$ . A sequência da hidrólise, redução e acetilação processou-se como já descrito para o item 3.2.3.4 e, os produtos obtidos foram analisados por g.l.c.-m.s, na coluna E (resultados na Tabela VII).

### 3.4 VISCOSIDADE DO POLISSACARÍDEO P<sup>59,120,128</sup>

Solução aquosa contendo 0,43 g% do polissacarídeo P (pH 4,7) foi utilizada para verificação da viscosidade a 25<sup>0</sup> em viscosímetro de OSTWALD analisando-se:

- a) Viscosidade absoluta;
- b) Viscosidade relativa e reduzida após a adição de eletrólitos ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $I^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ) em diferentes molaridades (1,0 - 3,0 M) (Figuras 11B e 11C);
- c) Viscosidade reduzida frente a variação de pH (Figura 11A).
- d) Viscosidade relativa em relação a diferentes temperaturas (Figura 11D).

As equações para os cálculos das viscosidades são as se

guintes:

$$1) \text{ Viscosidade absoluta } (\mu) = \mu_0 \frac{d}{d_0} \frac{t}{t_0}, \text{ onde aos va}$$

lores do solvente água é atribuído o índice zero. Determinando-se a densidade do polissacarídeo ( $d = 0,9838 \text{ g/mL}$ ) foi possível determinar a " $\mu$ " do polissacarídeo  $P = 444$  centipoises (c.p.s);

$$2) \text{ Viscosidade relativa } (\mu_r) = \frac{\mu}{\mu_0};$$

$$3) \text{ Viscosidade reduzida } (\mu_{red}) = \frac{1}{c} \frac{\mu - \mu_0}{\mu_0}, \text{ onde } \frac{\mu - \mu_0}{\mu_0} \text{ é a viscosidade específica } (\mu_{sp}).$$

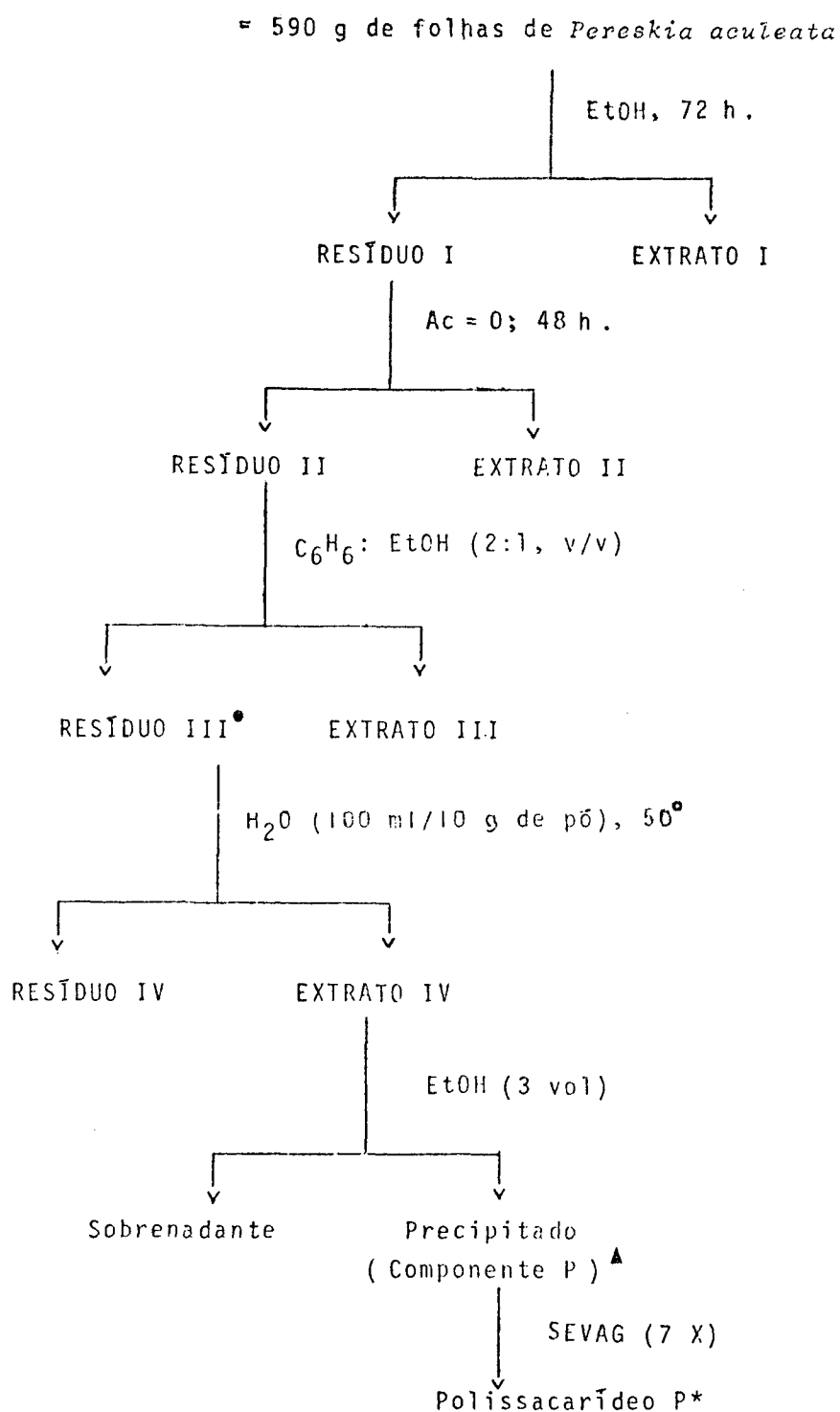
A viscosidade intrínseca foi determinada em gráfico, na intersecção do eixo dos valores de  $\mu_{red}$  versus concentração do polissacarídeo, onde  $c \rightarrow 0$  (Figura 11E).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO P

A extração aquosa a 50<sup>0</sup>, do pó acetônico de folhas de *Pereskia aculeata* (Esquema 1, Resíduo III), originou um extrato que após precipitação etanólica foi denominado de componente P que apresentou um rendimento de 1,8% em relação às folhas verdes, e 11,8% em relação ao pó acetônico. Quando relacionado à extração efetuada com água a 80<sup>0</sup><sup>123</sup>, esses valores correspondem a 2,13% e 19,7%, respectivamente. Entretanto, o processo de extração foi realizado a 50<sup>0</sup>, porque sabe-se que a temperatura alta pode causar migração e/ou remoção dos grupos O-acetílicos<sup>110</sup> e, a sua localização no polissacarídeo P, é também um dos objetivos deste trabalho. Os rendimentos encontrados, com relação a base seca, foram considerados satisfatórios e são comparáveis aos obtidos para carragenanas e alginatos (1-40%), que apresentam propriedades físicas e físico-químicas semelhantes às do polímero de *Pereskia aculeata*<sup>114</sup>.

A solubilidade em H<sub>2</sub>O do componente P, serviu de indicativo de que o material extraído se enquadra entre as substâncias mucilaginosas<sup>75,78</sup> que podem ser encontradas normalmente na parede primária e na lamela média de alguns vegetais<sup>135</sup>.



**ESQUEMA 1 - PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM DE FOLHAS DE *Pereskia aculeata* MILL.**

●  $\approx$  90 g; 15,2% a partir das folhas verdes;

▲  $\approx$  10,6 g; 11,8% a partir do pó tratado com  $C_6H_6$ :

EtOH e 1,8% a partir das folhas verdes;

\*  $\approx$  9,3 g; 1,6% a partir das folhas verdes.

A precipitação do componente P do meio aquoso ocorreu imediatamente após adição de cetavlon e não houve fracionamento do material desde que o sobrenadante apresentou fenol-sulfúrico negativo. Assim optou-se pelo isolamento do componente P, da solução aquosa, por precipitação direta com etanol (3-4 volumes).

Na prática, observa-se que os polissacarídeos extraídos de diversos órgãos e/ou vegetais<sup>33,132</sup> nem sempre apresentam a mesma facilidade nos processos extrativos e de purificação. Muitos polímeros requerem o tratamento ácido ou alcalino, além da solubilidade em solventes como o DMSO ou etanol a quente e/ou a complexação com sais de cobre e de EDTA<sup>114,132</sup> o que faz com que o custo operacional seja elevado.

#### 4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO P.

O componente P, após o tratamento desproteinizante de SEVAG<sup>131</sup>, passou a ser denominado de polissacarídeo P, que é constituído por uma heteroglicana, formada principalmente por arabinose e galactose. Contém, ainda, 3,5 g% de proteína e outros constituintes a saber: cálcio (1,9 g%), fosfato (0,5 g%), hexosamina (0,59 moles%), acetil (25 moles%) e metoxil (13,8 moles%). A composição em monossacarídeo arabinose: galactose: ramnose: ácido galacturônico apresenta a seguinte relação molar: 5,1: 8,2: 1,2: 1,0. (Ver Tabelas I e II)

TABELA I

## DADOS ANALÍTICOS DO POLISSACARÍDEO P

Determinações	g%
Açúcar total	51,5
Nitrogênio	0,56
Proteínas	3,5
Ácido urônico*	11,7
Hexosamina*	0,6
Cálcio*	1,9
Fosfato*	0,5
Acetil*	6,7
Metoxil*	2,9
Umidade	16,2

\* em relação ao açúcar total <sup>51</sup>

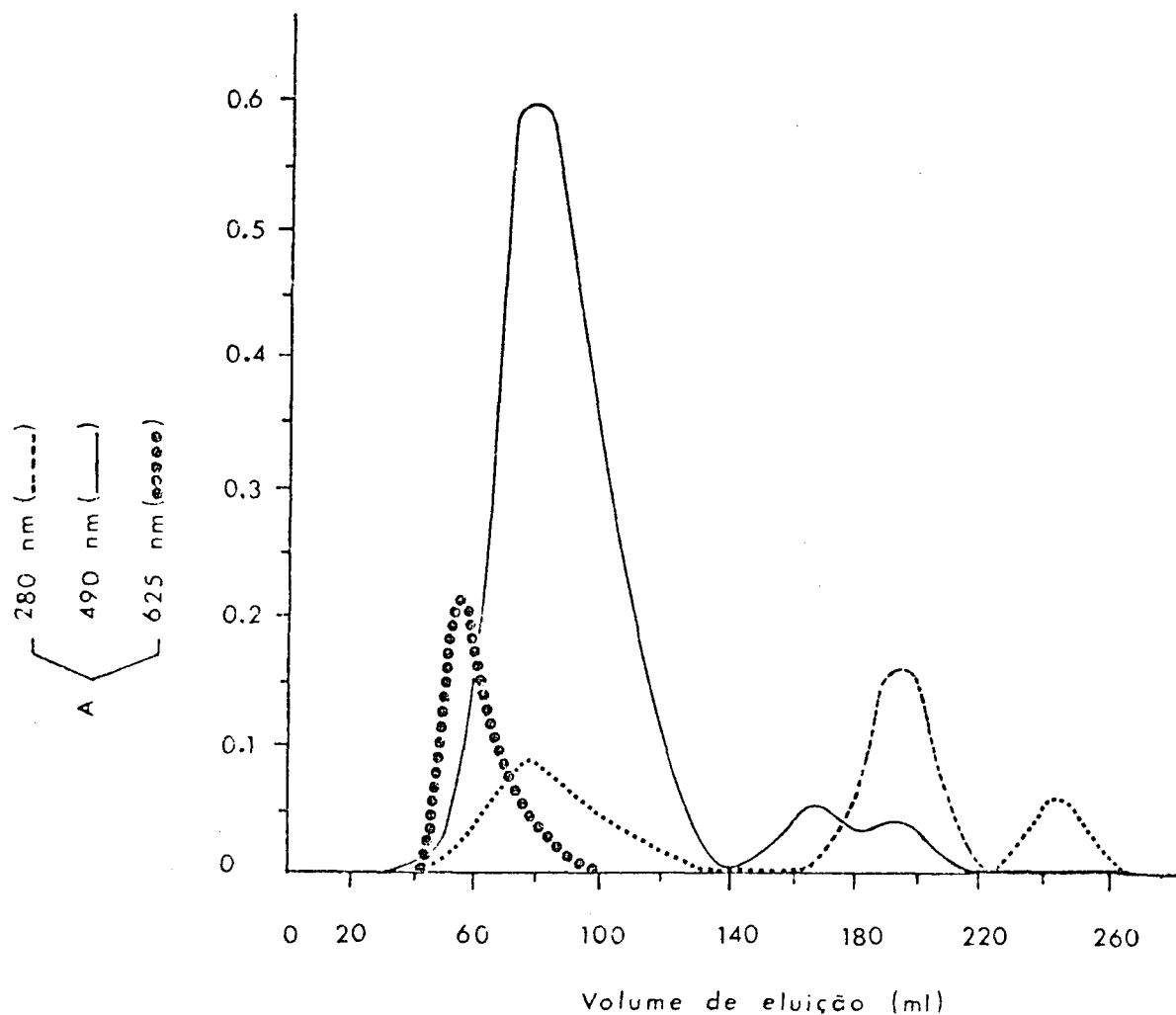
#### 4.3 ESTUDO DA HOMO OU HETEROGENEIDADE DO POLISSACARÍDEO P

O polissacarídeo P foi investigado por várias técnicas, para determinar a sua homo ou heterogeneidade. A análise em fita de acetato celulose, em tampão borato, revelou o aparecimento de uma única banda.

Na Figura 1 o perfil de eluição do polissacarídeo P em Bio-Gel A5 M indicou a predominância de um pico simétrico acomo



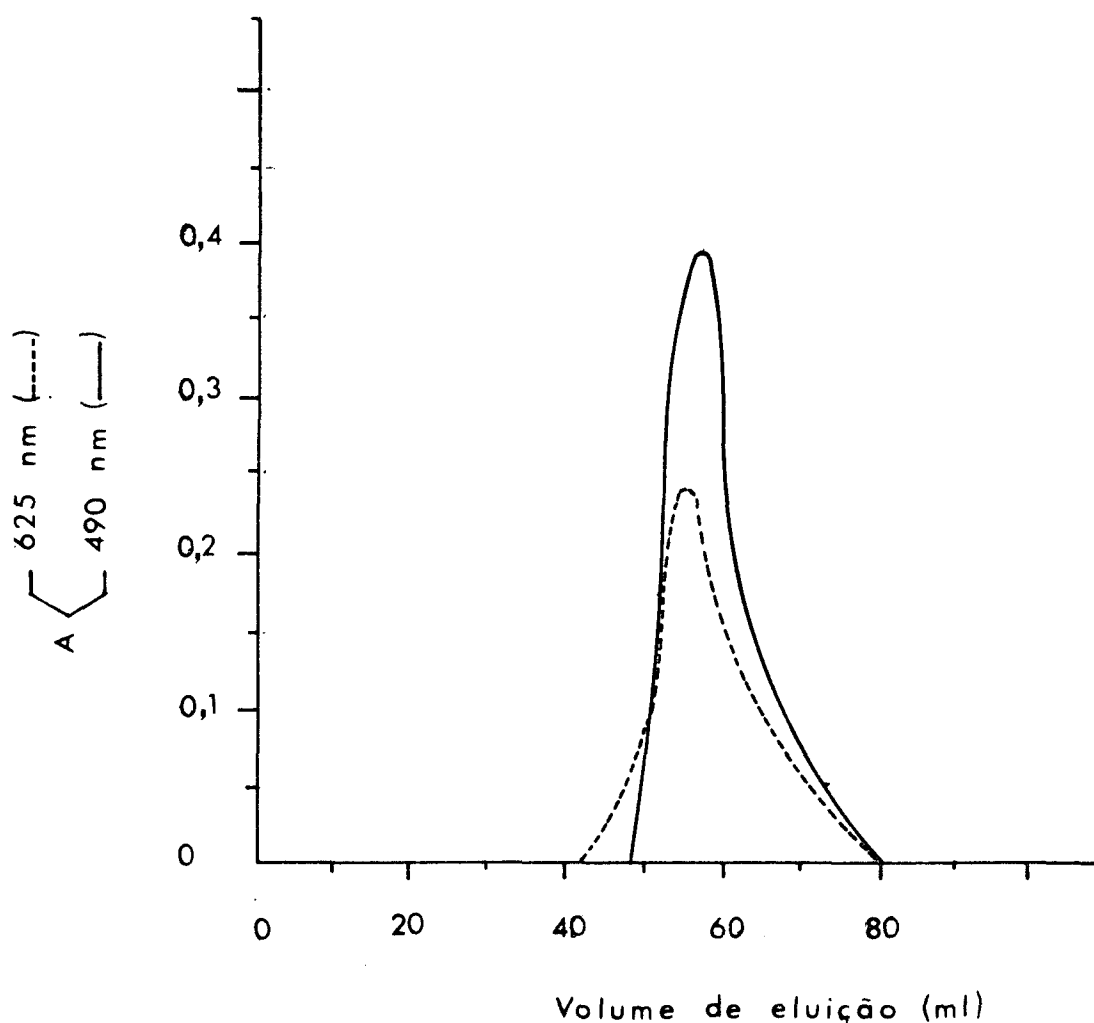
panhado pela absorção a 490 nm, açúcar total<sup>51</sup> e a 280 nm (proteína). O perfil dessa análise demonstra a presença de uma proteoglicana que contém 3,5% de proteínas em relação ao polissacarídeo (Tabela I).



**Fig. 1** - Filtração em Bio-Gel A5 M do polissacarídeo P (coluna 45 cm X 2 cm, d.i.). Eluente tampão fosfato 0,1 M; pH 8,0). Coluna calibrada com Blue Dextran (●●●●●). Cada tubo foi analisado para carboidrato (————) e proteína (-----).

Comparando a eluição do Blue Dextran e o seu P.M. observa-se que o polissacarídeo P de *Pereskia aculeata* apresenta um P.M. pouco inferior a  $2.10^6$ . Esses resultados confirmam as análises em Sepharose 6B da Figura 2.

A filtração em gel de Sephadex G-200 do polissacarídeo P colorido com Azul de Procion M-3G e eluído com água, revelou inicialmente o aparecimento de três bandas difusas. Porém, devido a alta viscosidade bem como à lentidão no processo de eluição da amostra, não foi possível a separação e análise das respectivas frações.



**Fig. 2** - Filtração em Gel Sepharose 6B do polissacarídeo P (coluna 40 cm X 2 cm, d.i.). Eluente tampão tris-HCL 0,05 M, pH 7,2). A coluna foi calibrada com Blue Dextran ( ---- ) e cada tubo foi analisado para carboidrato ( — ).

A solução aquosa do polissacarídeo P (1,5 g/100 ml) foi aplicada em uma coluna de DEAE-celulose (forma  $\text{Cl}^-$ ) e eluída inicialmente com  $\text{H}_2\text{O}$  (310 mL) até apresentar reação negativa para o fenol sulfúrico<sup>51</sup>, o eluato aquoso foi concentrado e o volume reduzido precipitado com EtOH (3 volumes). O precipitado obtido foi separado por centrifugação, lavado sequencialmente com etanol e acetona e secado à vácuo, originando a fração F-1. A sequência da eluição foi realizada conforme descrito no item 3.2.2 de MATERIAIS E MÉTODOS, onde o fracionamento do polissacarídeo P, nessa coluna de troca iônica, permitiu a separação de três frações principais (F-2, F-3 e F-7), por diferença e densidade de cargas.

#### 4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES F-2, F-3 e F-7.

Essas frações ao serem analisadas indicaram composições químicas qualitativas semelhantes (ver Figura 3 e Tabelas I, II, III e IV).

As relações molares (Tabela II) dos monossacarídeos fucose: arabinose: galactose: ramnose: ácido galacturônico são: 1,0: 20,8: 15,5: 1,5: 2,8 para a fração F-2; traços: 16,7: 22,2: 1,0: 5,5 para a fração F-3, e 1,5 : 25,4: 18,1: 1,0: 1,6 para a fração F-7. Porém, pelos dados a serem discutidos posteriormente essas frações são estruturalmente diferentes, caracterizando o polissacarídeo P como uma amostra heterogênea quanto à natureza física, química e físico-química.

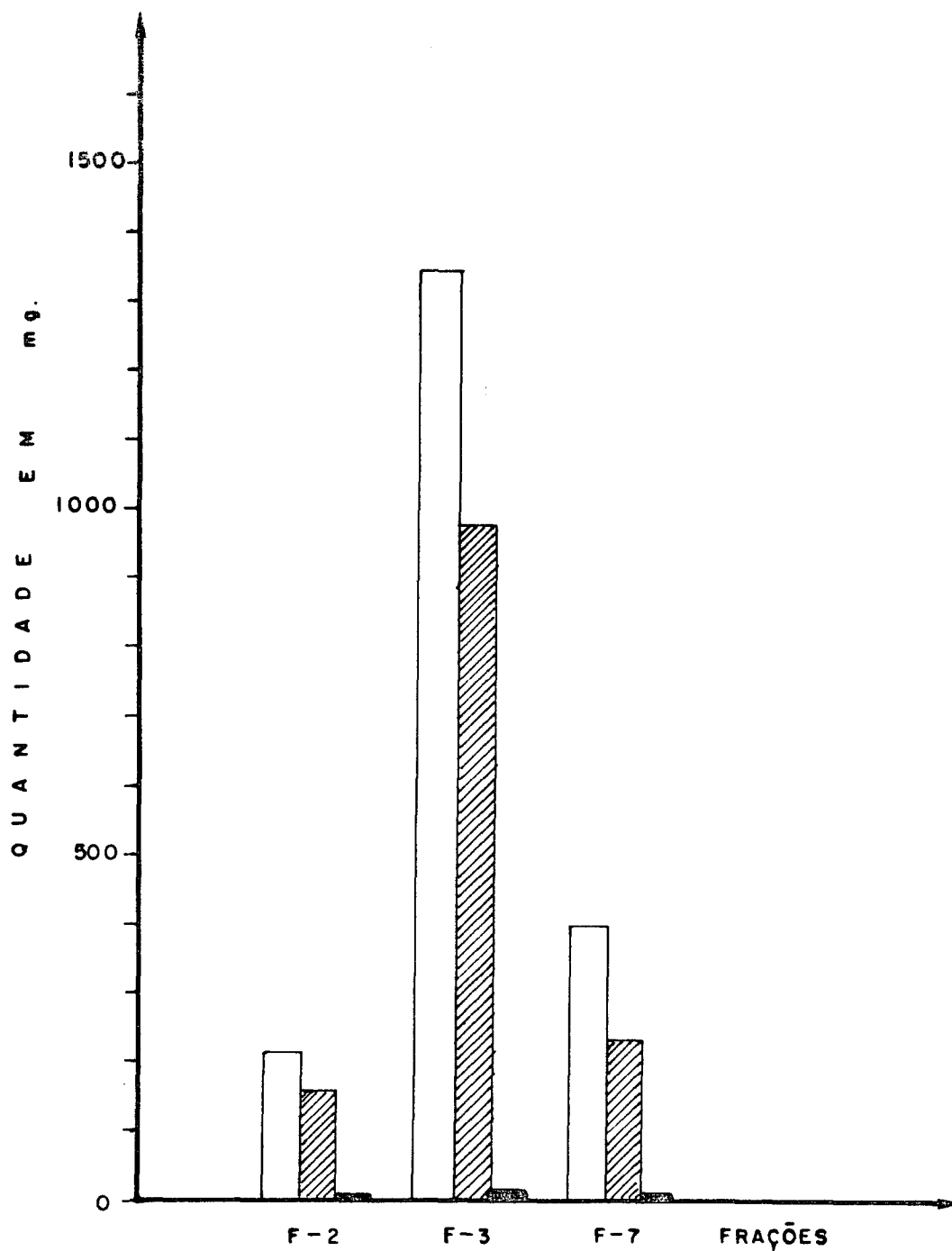


Fig. 3 - Proporção dos componentes das três principais frações obtidas a partir do polissacarídeo P, após cromatografia em DEAE-celulose, forma  $\text{Cl}^-$  (□, amostra total; ▨, carboidrato total<sup>51</sup>; ■, proteína<sup>80</sup>).

A fração predominante (F-3), que representa 70% do polissacarídeo P, é constituída por um mesmo núcleo central e

possui cadeias laterais semelhantes às demais frações minoritárias (F-2 e F-7), conforme observado pelos resultados de metilação e espectroscopias de ressonância nuclear magnética. Assim, para estudos de análise estrutural foi, também, considerado o polissacarídeo P.

#### 4.5 COMPOSIÇÃO DE P-1 EM MONOSSACARÍDEOS

Quando submetido à degradação através da hidrólise ácida parcial (TFA 0,02 M, 100<sup>0</sup>, 2 h), o polissacarídeo P possibilitou a formação do polissacarídeo P-1, que foi precipitado com etanol. A relação molar dos monossacarídeos (Tabela II) arabinose: galactose: ramnose: ácido galacturônico é 0,5: 6,0: 1,4: 1,0. O sobrenadante alcoólico, fração hidrolisada S-1, apresenta relação molar arabinose: galactose 9:1. Isso demonstra que a maioria das unidades de arabinose foram removidas de P, originando P-1, formado basicamente por unidades de galactose e que constituem o(s) núcleo(s) do(s) polímero(s).

#### 4.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO P E DE SEUS COMPONENTES.

Os resultados preliminares da estrutura do polissacarídeo P e de seus componentes (F-2, F-3 e F-7) resultantes de fracionamento em DEAE, foram obtidos inicialmente pela análise de <sup>1</sup>H-n.m.r. Nas Figuras 4A-4C, espectros das frações F-2, F-3 e

F-7, respectivamente; e na Figura 5, espectro do polissacarídeo P as ressonâncias a  $\delta$  2,3-2,6 correspondem aos prótons de grupos metílicos de substituintes O-acetílicos.

TABELA II

COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS DETERMINADA POR g.l.c.<sup>x</sup>, NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS E POLARIMETRIA DAS DIFERENTES AMOSTRAS DA MUCILAGEM DE PERESKIA ACULEATA

Amostra	Mol%						$[\alpha]_D$
	<u>L</u> -Rha	<u>L</u> -Fuc	<u>L</u> -Ara	<u>D</u> -Xil	<u>D</u> -Gal	Ácido Urônico <sup>a</sup>	
P	11,1	traços	31,7	traços	51,0	6,2	- 29 <sup>0</sup>
S-1	-	-	90,0	traços	10,0	-	-
P-1	16,0	traços	4,0	-	68,5	11,5	+ 49 <sup>0</sup>
FA <sup>▲</sup>	26,6	6,0	32,4	-	35,0	-	-
F-2	2,4	3,6	50,0	-	37,3	6,7	- 35,0 <sup>0</sup>
F-3	2,2	traços	36,8	-	48,8	12,2	+ 89,6 <sup>0</sup>
F-7	2,1	3,2	53,3	-	38,0	3,4	- 37,9 <sup>0</sup>
P-β	10,0	-	42,9	.	40,4	6,7	-

<sup>x</sup> na coluna A e B;

<sup>▲</sup> carboxi-reduzido, hidrolisado, reduzido e acetilado;

<sup>a</sup> pelo método de carbazol.

TABELA III

DADOS ANALÍTICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO DO POLISSACARÍDEO P EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE, FORMA  $Cl^-$

Frações	Eluato	Amostra (mg)	A.T* (mg)	g%			moles%		Metoxil	
				R <sup>o</sup>	N	Proteína	Fosfato <sup>●</sup>	Acetil <sup>o</sup>		Hexosamina <sup>●</sup>
F-1	Aquoso	nd	17,5	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F-2	NaCl 0,10 <u>M</u>	218	147,0	9,8	0,27	1,7	0,23	10,7	0,74	nd
F-3	NaCl 0,25 <u>M</u>	1354	970,0	64,7	0,13	0,8	0,11	14,5	0,88	22,4
F-4	NaCl 0,50 <u>M</u>	nd	25,0	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F-5	NaCl 0,75 <u>M</u>	nd	4,2	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F-6	NaCl 1,00 <u>M</u>	nd	6,0	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F-7	HCl 0,10 <u>M</u>	412	230,0	15,3	0,18	1,1	0,38	10,3	1,0	nd
F-8	HCl 0,25 <u>M</u>	nd	24,0	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd

- \* Determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico<sup>51</sup>;  
 R Rendimento, em relação ao polissacarídeo P;  
 ● Em relação ao açúcar total;  
 nd Não determinado.

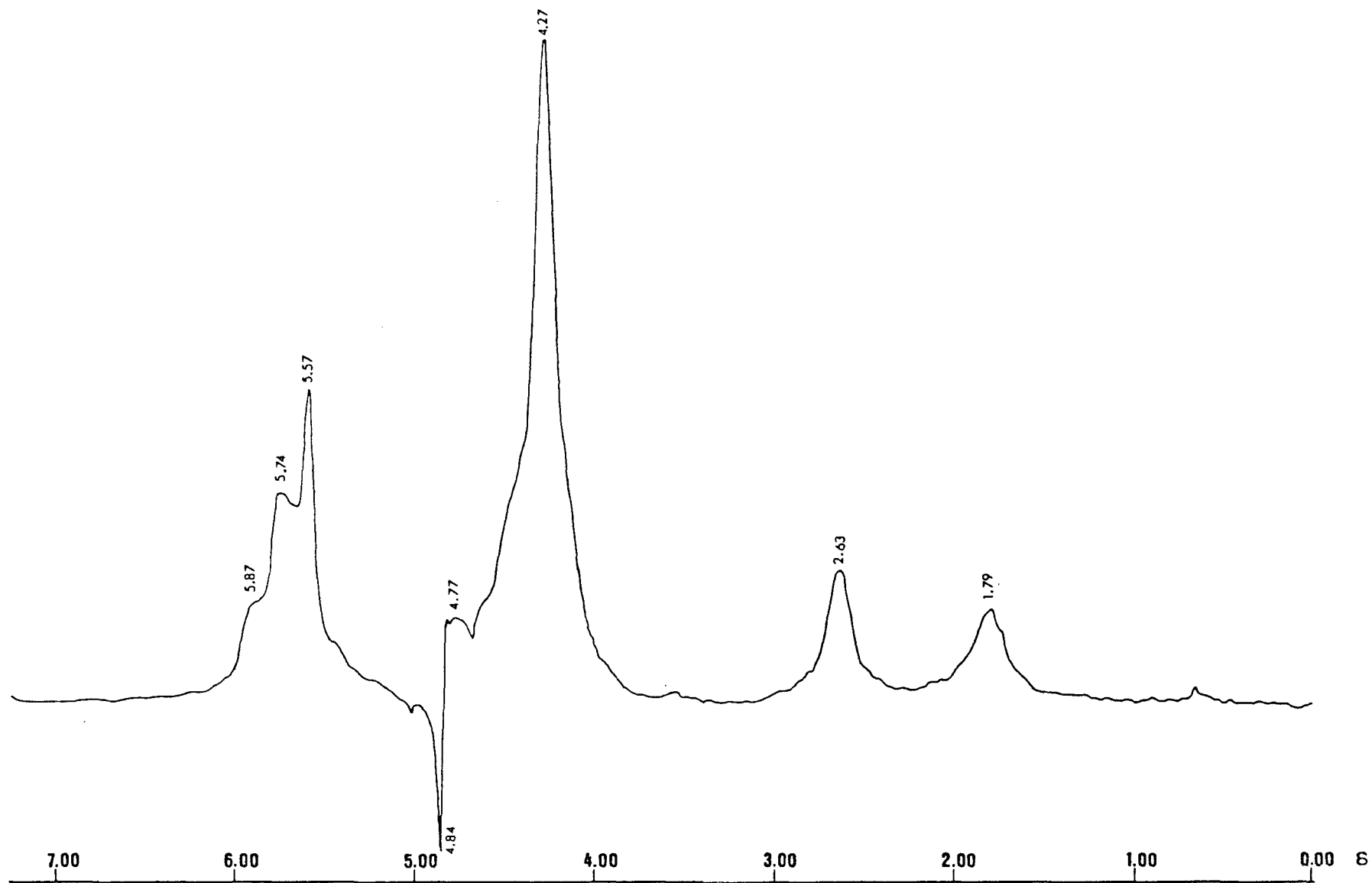


Fig. 4A - Espectro de  $^1\text{H}$ -n.m.r da fração F-2, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.



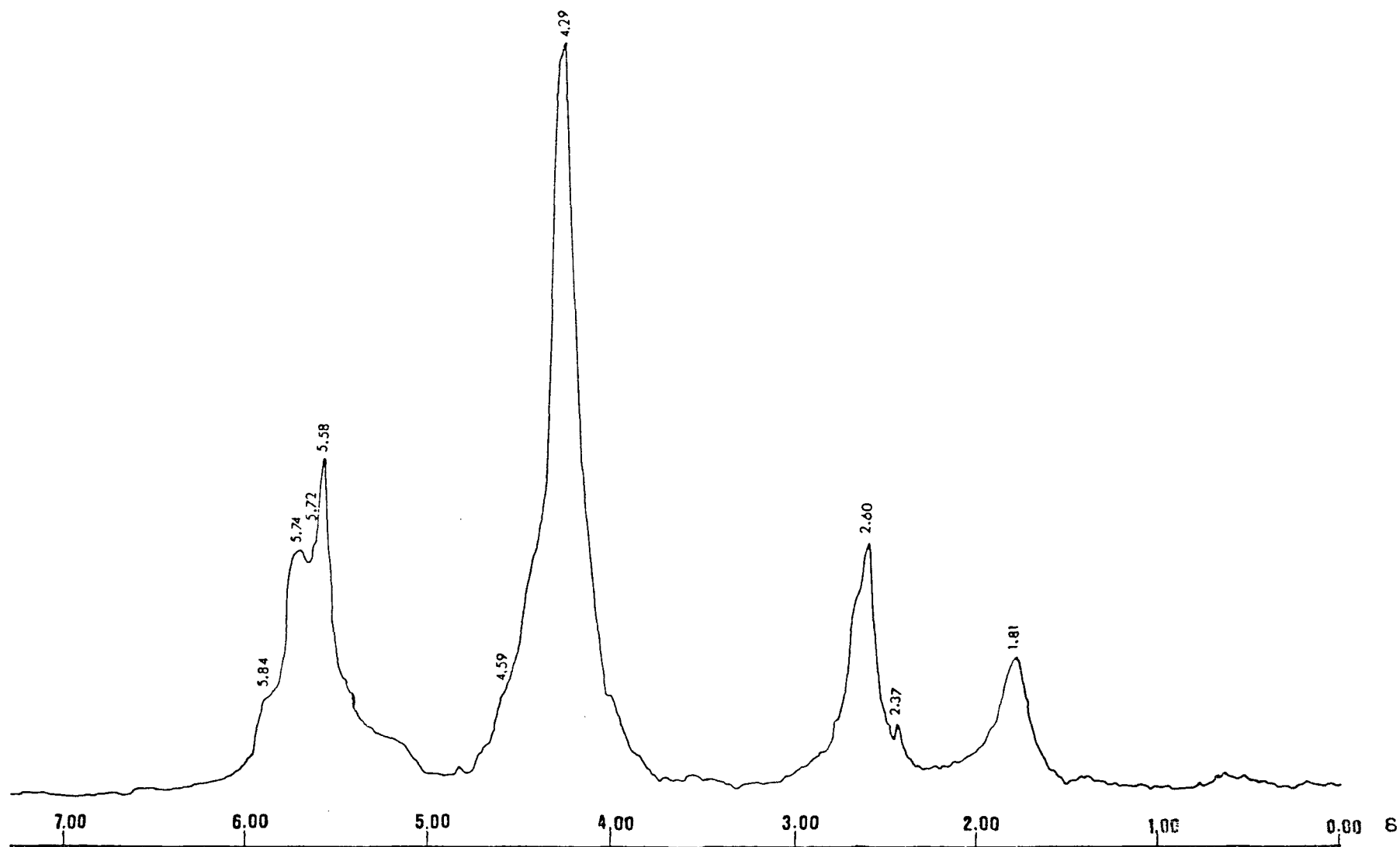


Fig. 4B - Espectro de  $^1\text{H}$ -n.m.r da fração F-3, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

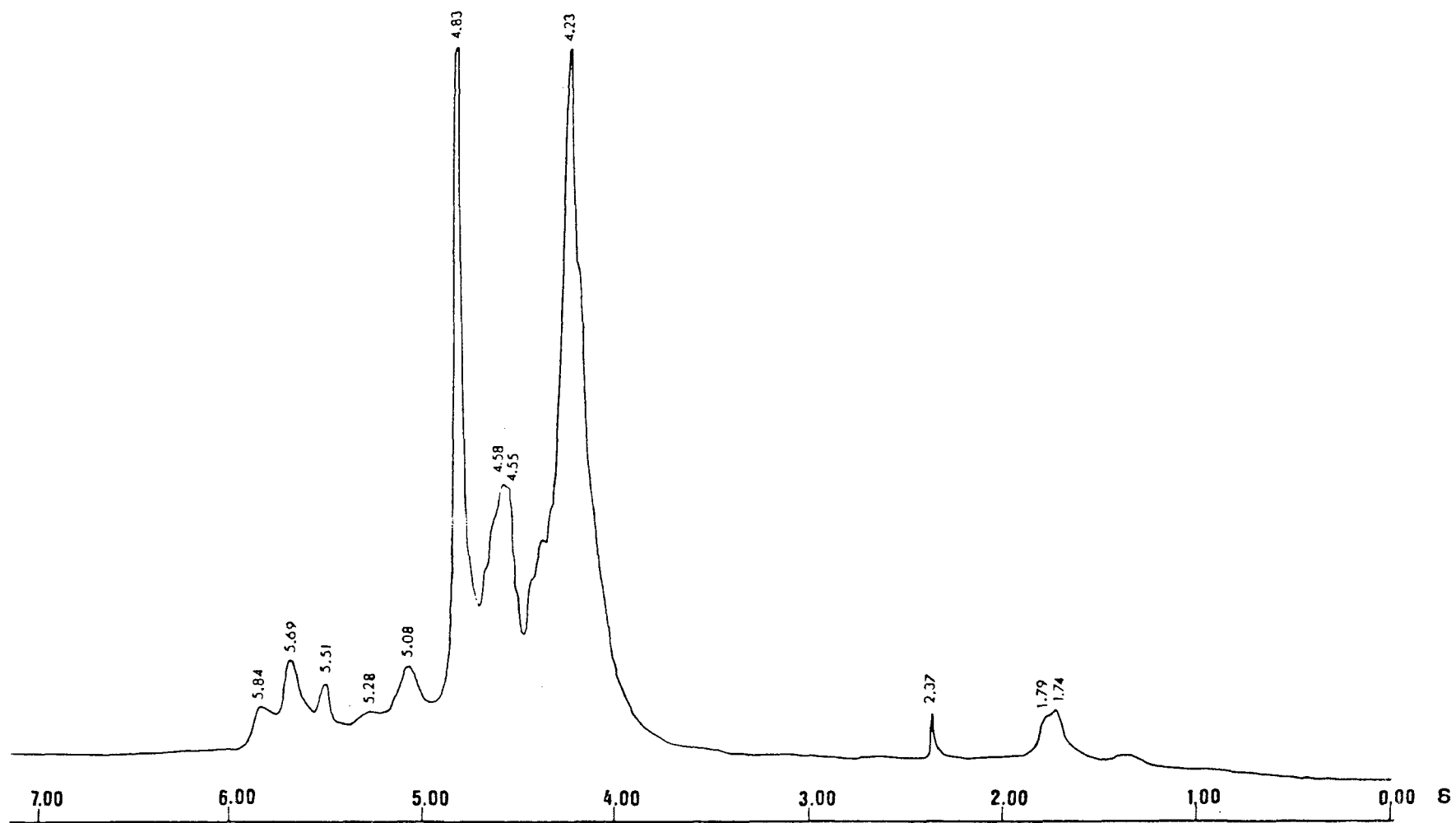


Fig. 4C - Espectro de  $^1\text{H}$ -n.m.r da fração F-7, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

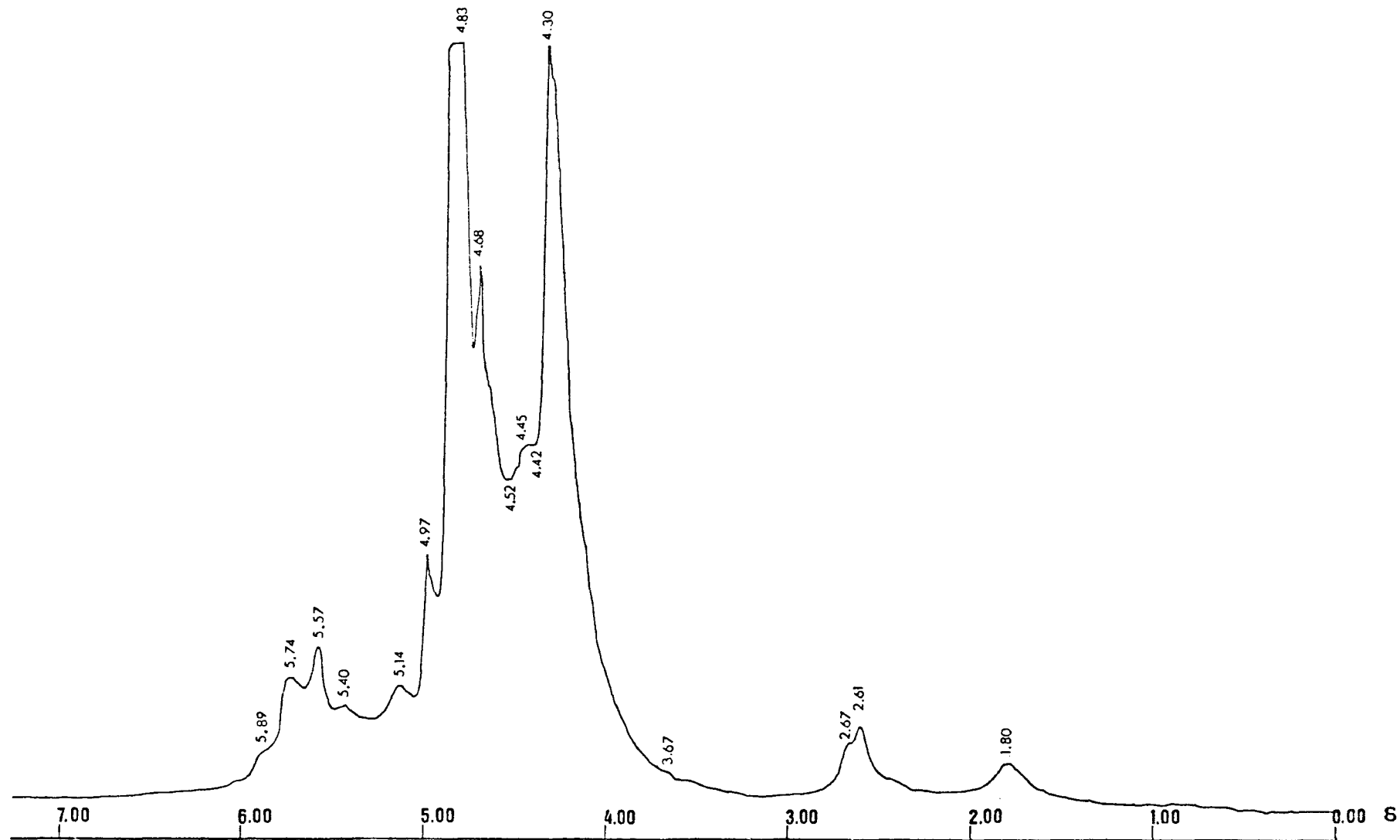


Fig. 5 - Espectro de  $^1\text{H}$ -n.m.r do polissacarídeo P e de *Pereskia aculeata*, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

A presença de 6-deoxiaçúcar foi caracterizada pelos sinais de seus grupos metílicos em C-6 em campo alto a  $\delta$  1,7 - 1,8<sup>106</sup>. Para o espectro da Figura 5, relacionando-se as áreas dos sinais do CH<sub>3</sub> de deoxiaçúcar e de CH<sub>3</sub> de grupos O-acetílicos, a análise quantitativa demonstra que a área do sinal atribuído ao CH<sub>3</sub> de grupos O-acetílicos corresponde a 59,6% em relação à do CH<sub>3</sub> do deoxiaçúcar. Esse resultado, transposto à percentagem de ramnose no polímero (11,1% Tabela II), indica que há cerca de 6,5% de grupos O-acetílicos, ou ainda 25 moles% em relação ao carboidrato total. Portanto, o valor de substituintes O-acetílicos, obtidos por <sup>1</sup>H-.n.m.r, é muito próximo ao obtido pela dosagem química (Tabela I).

Outros resultados preliminares da estrutura foram obtidos por espectroscopia de <sup>13</sup>C-n.m.r. Nos espectros de <sup>13</sup>C-n.m.r das frações F-2, F-3 e F-7 (Figuras 6A-6C) os sinais aparecem bem definidos. Na região de  $\delta$  90-110 são característicos para os carbonos anoméricos. Já as ressonâncias na região  $\delta$  68-85 correspondem as dos átomos de C-2 a C-5 enquanto na região  $\delta$  62-67 são atribuídos a grupos alcoólicos primários não substituídos presentes em unidades de  $\beta$ -D-Galp. Isso indica que o C-6 dos grupos galactosil terminais, bem como os da cadeia interna não estão substituídos glicosidicamente, o que foi confirmado pela análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (ver resultados de metilação, Tabela IV).

Todos os espectros das Figuras 6A-6C mostram ressonâncias na região a  $\delta$  18,1-18,6, que correspondem ao grupo metílico de 6-deoxihexose, enquanto os sinais presentes a  $\delta$  20-22,6 para a fração F-2 (Figura 6A) e F-3 (Figura 6B), correspondem aos grupos N-acetil e/ou O-acetil.

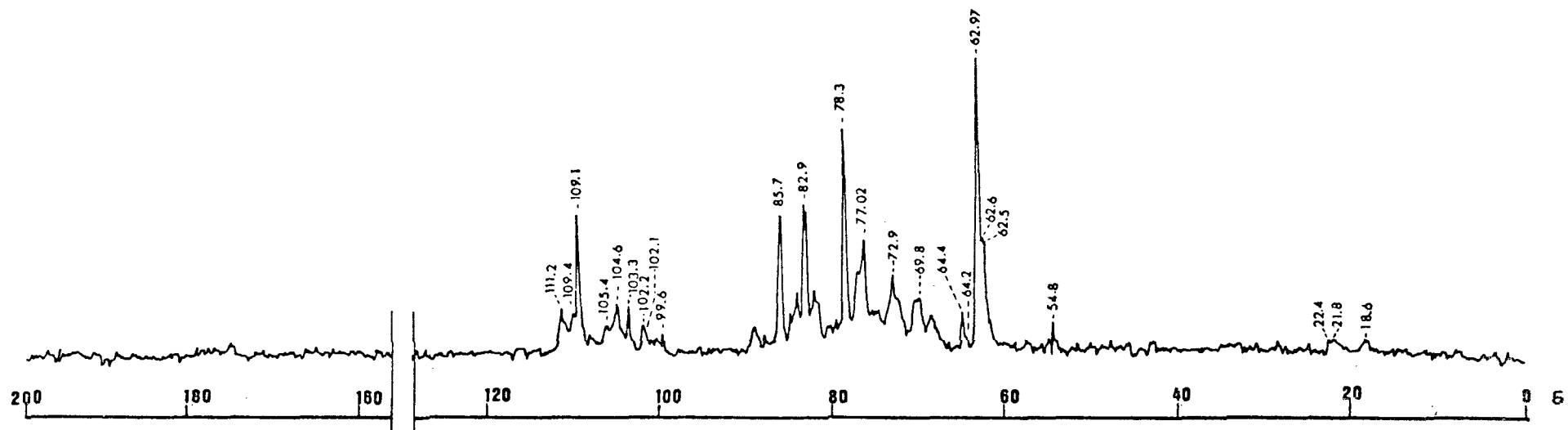


Fig. 6A - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r da fração F-2, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

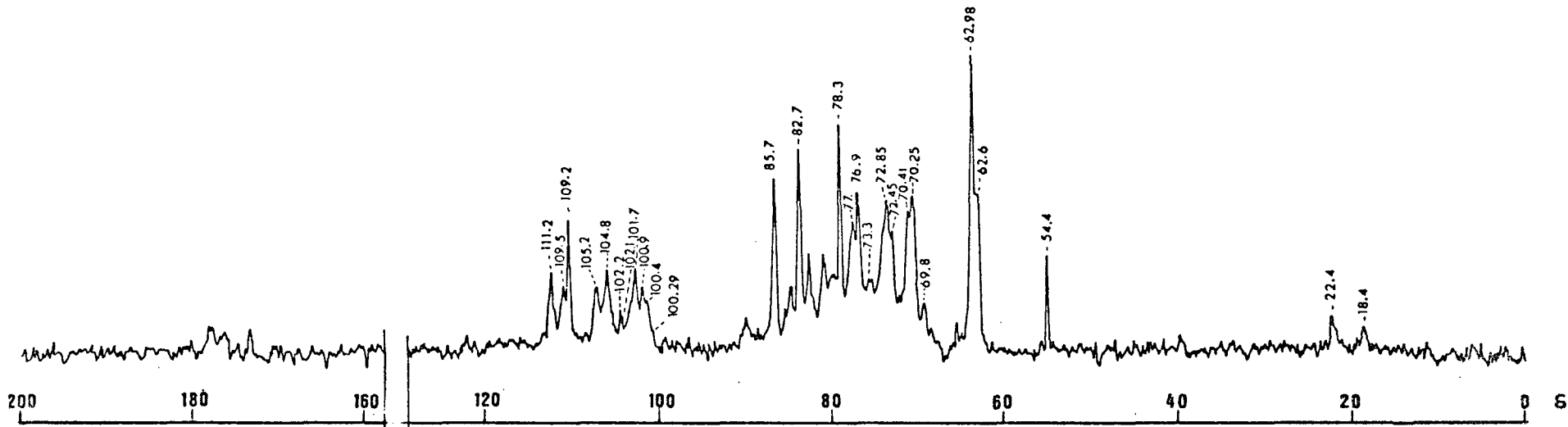


Fig. 6B - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r da fração F-3, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

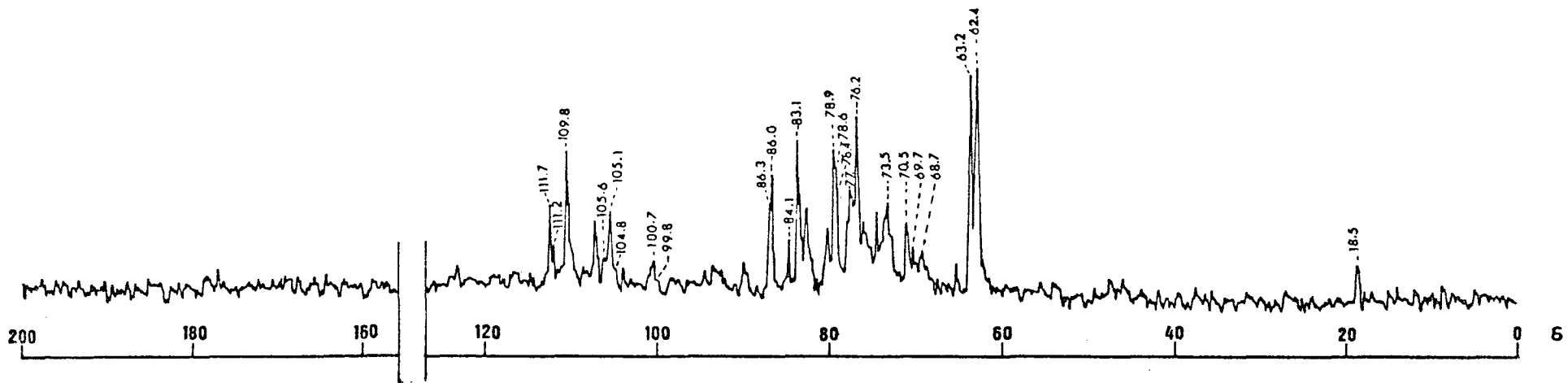


Fig. 6C - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da fração F-7, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

A ressonância próxima a  $\delta$  78,3 (Figuras 6A-6C) é equivalente ao C-3 de unidades de  $\underline{\underline{L}}$ -ramnopiranosil, substituída em O-2.0 sinal  $\delta$  105,2 presente na fração F-3 (Figura 6B) é consistente com o do C-1 de unidades de  $\underline{\underline{L}}$ -ramnosil. Todavia, é difícil estabelecer a sua configuração anomérica desde que as ressonâncias dos anomeros  $\alpha$  e  $\beta$  são muito próximas<sup>60</sup>. Em geral os sinais químicos de  $^{13}\text{C}$  para o C-1 de unidades de ramnopiranosose têm pouco valor de análise, porém aqueles para C-3 e C-2 são considerados bastante úteis<sup>26</sup>.

Na fração mais abundante, F-3 (Figura 6B), os sinais a  $\delta$  69,4; 70,4; 73,3; 102,1 e  $\sim$  172 são oriundos de unidades de ácido  $\alpha$ -galacturônico ligadas (1 $\rightarrow$ 4) presentes na amostra (ver análise de metilação  $\text{P}^0$ , Tabela V). Em comparação com o trabalho de KEENAN et alii<sup>83</sup> esses sinais pertencem às cadeias laterais e/ou cadeias terminais móveis e não são representativas do esqueleto do material. A alta percentagem de Galp (12,2 moles%, Tabela II) nessa fração, bem como o conteúdo de metoxil (22,4 moles%, Tabela III), sugerem que o ácido urônico está esterificado. Isso foi confirmado detectando-se um sinal intenso a  $\delta$  54,4 (Figura 6B), que é característico para o grupo  $\text{CO}_2\text{Me}$  de unidades de ácido urônico esterificadas, enquanto as ressonâncias a  $\delta$  22 e  $\delta$  172 seriam provenientes, respectivamente, da metila e da carbonila de substituintes O-acetílicos. As ressonâncias de grupos O-acetílicos são equivalentes às encontradas em polissacarídeos de bactérias<sup>77,79</sup> e em O-acetil xilanas de vegetais superiores<sup>110</sup>.

Por comparação com a fração F-3 (Figura 6B), na fração F-2 (Figura 6A), também foi encontrado ácido urônico esterificado, porém, em menor proporção.



Outros resultados da estrutura fina foram deduzidos por análise comparativa da espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r do polissacarídeo P e de seus componentes.

No espectro da Figura 7A, os sinais obtidos com a solução de P em  $\text{D}_2\text{O}$  foram pouco definidos, provavelmente em função da alta viscosidade da amostra em água; todavia, evidenciou-se um sinal em campo baixo a  $\delta$  108,8 que corresponde ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranose. Usando-se DMSO como solvente, sinais bem definidos foram obtidos no espectro do polissacarídeo P (Figura 7B), os quais correspondem ao C-5, C-4, C-3, C-2 e C-1 das unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranose a  $\delta$  61,2; 76,9; 81,8; 83,7 e 107,9, respectivamente<sup>60</sup>. Observou-se que esses sinais aparecem sobrepostos a alguns oriundo(s) do(s) núcleo(s) do(s) polissacarídeo(s) cujo movimento molecular é limitado<sup>61</sup>. Esse comportamento é análogo ao descrito para uma solução de cartilagem nasal bovina, constituída por uma proteoglicana e condroitina-sulfato que, devido à mobilidade da molécula, apresentou sinais em  $^{13}\text{C}$ -n.m.r, enquanto que no colágeno, que possui movimento molecular severamente limitado, as ressonâncias não apareceram<sup>31</sup>. Experimentos anteriores previamente mencionados de cromatografia do polissacarídeo P colorido com Azul de Procion em coluna de Sephadex G-200, e em cromatografia em DEAE-celulose indicaram que a amostra P é heterogênea. Também, o fracionamento em DEAE apresentou três frações principais cujos espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r em  $\text{D}_2\text{O}$  foram bem mais definidos (Figuras 6A-6C), quando comparados ao do polissacarídeo P (Figura 7A). A fração F-2 (Figura 6A), que corresponde à de menor rendimento (147 mg, 9,8 g% em relação a P, Tabela III), apresenta

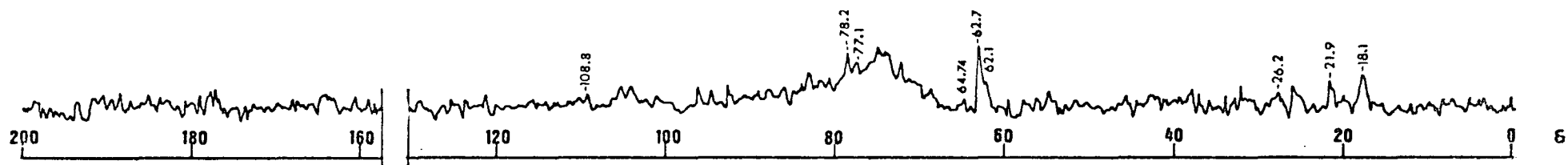


Fig. 7A - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r do polissacarídeo P de *Pereskia aculeata*, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

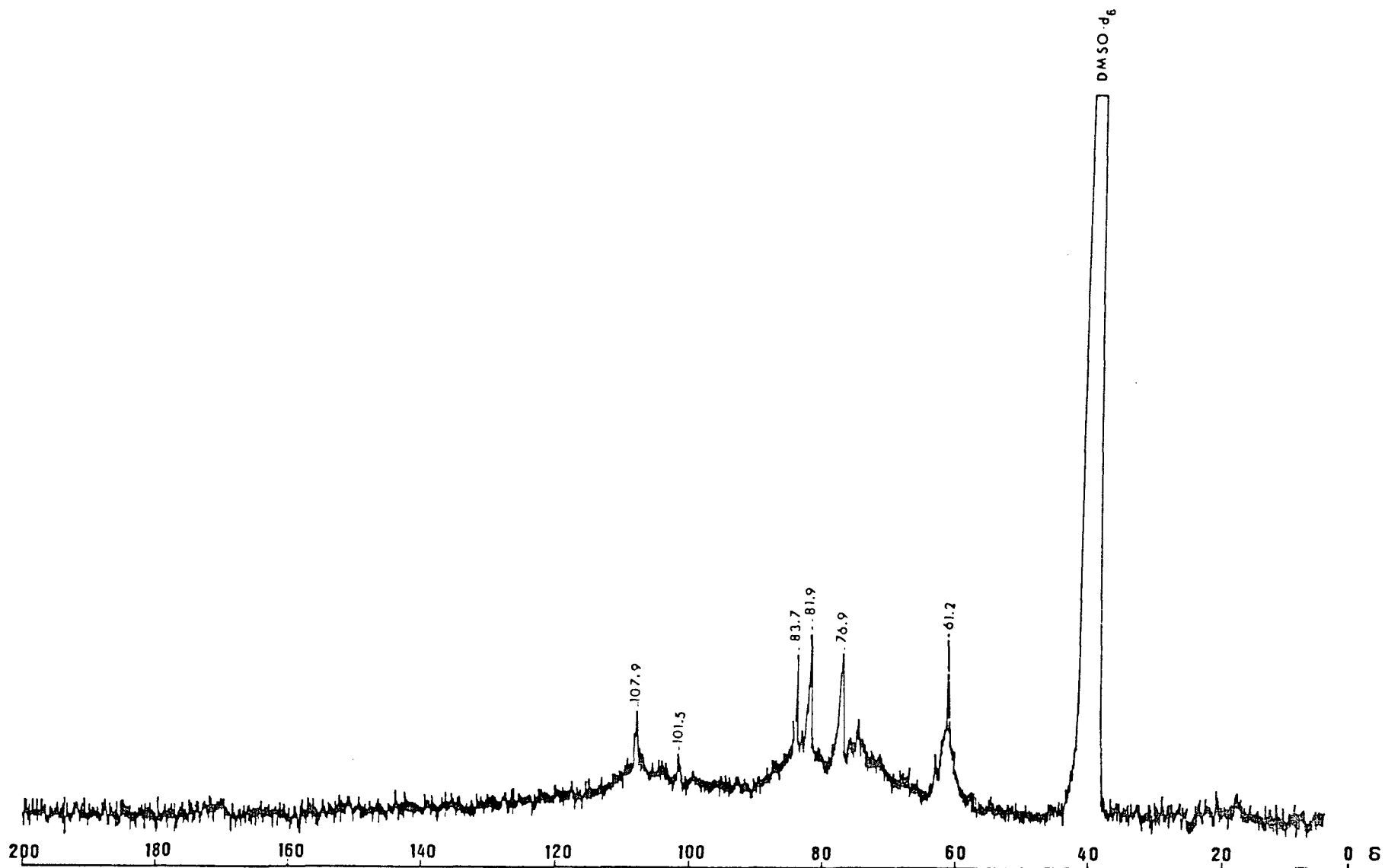


Fig. 7B - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r do polissacarídeo P de *Pereskia aculeata*, em dimetil-sulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}^2\text{H}_6$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

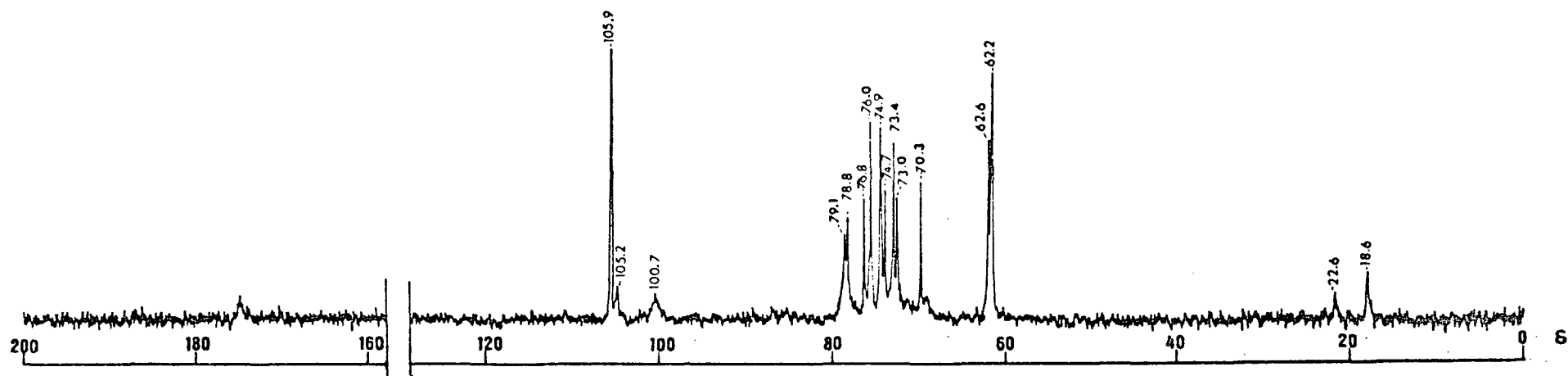


Fig. 7C - Espectro de <sup>13</sup>C-n.m.r do polissacarídeo P-1 de *Pereskia aculeata*, em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O), a 70°. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

em  $D_2O$  cinco sinais principais, aproximadamente comparáveis aos observados no espectro do polissacarídeo P em DMSO. Uma explicação para esse resultado seria que o tratamento de SEVAG, ao qual foi submetido o material aquoso extraído de *Pereskia aculeata*, não removeu toda a proteína não covalentemente ligada com a maioria do polissacarídeo formando, um complexo altamente viscoso, semelhante à interação carboidrato-lectina. Como a proteína pode não ser específica para as unidades de arabinose predominantes na fração F-2, ela permanece suficientemente móvel para dar os sinais de  $^{13}C$ -n.m.r. Portanto, a definição nos espectros após a passagem do polissacarídeo P através da DEAE-celulose pode ser explicada se a coluna foi capaz de remover a proteína associada por pontes de hidrogênio (ver conteúdo proteico, Tabela III), originando polissacarídeos não complexados, que são progressivamente eluídos com solução de NaCl e HCl respectivamente.

No espectro de  $^{13}C$ -n.m.r do polissacarídeo P-1 (Figura 7C) outros sinais para C-1 foram obtidos a  $\delta$  105,2 que bem poderiam ser unidades de  $\alpha$ -ramnopiranosil presentes no núcleo do polímero (ver Tabela V, dados de metilação). Esse mesmo espectro apresenta ressonância em campo baixo a  $\delta$  105,9 e indica que as unidades de galactopiranosose têm a configuração  $\beta^{60,62}$ .

Desde que P-1 apresentou um valor alto para a rotação específica ( $+49^\circ$ ) em relação ao polissacarídeo P ( $-29^\circ$ ), a contribuição das unidades de arabinofuranosil removidas pela hidrólise ácida parcial é negativa e, portanto, mostra que elas têm a forma  $\alpha$ -L, enquanto que a análise de P-1 com galactose oxidase indicou que as unidades de galactose têm a forma D.

As rotações específicas para as frações F-2 ( $-35^{\circ}$ ) e F-7 ( $-37,9^{\circ}$ ) indicam por analogia configuração  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente para L-Araf e D-Galp. Para F-3 ( $+89,6^{\circ}$ ) o valor alto positivo pode ser decorrente do alto conteúdo de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico, 12,2 moles% nessa fração.

Outras análises complementares da estrutura fina do polissacarídeo foram feitas usando-se a técnica de metilação e a análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados por g.l.c-m.s.

Para as frações F-2 e F-3 bem como para o polissacarídeo P (Tabelas IV e V), a obtenção de 2,3,5-tri-O-metilarabinitol mostrou que a maioria das unidades de L-arabinofuranosil são grupos terminais não redutores, ocorrendo, ainda, o 3-O-metilarabinitol. Assim, as unidades terminais não redutoras de Araf de vem estar ligadas glicosidicamente a unidades de arabinosil adjacentes 2,5 e/ou 2,4-di-O-substituídas.

Esses monossacarídeos poderiam ser, então, responsáveis pelo sinal de C-1 a  $\delta$  101,5 na Figura 7B (P em DMSO) e a  $\delta$  101,7 na Figura 6B (F-3) que poderia ser de  $\beta$ -arabinopiranosil ou  $\beta$ -arabinofuranosil (observar sinal de C-1 de metil  $\beta$ -Arap e  $\beta$ -Araf, ref.60). Os dados de metilação obtidos na análise de P-1 e da fração F-3 (Tabelas IV e V) sugerem a presença de unidades de  $\beta$ -arabinopiranosose. O componente P-1 contém unidades de arabinosil não completamente removidas pela hidrólise ácida parcial e estas deram lugar a traços de acetatos de 2,3,4-tri-O-metilarabinitol, oriundos de grupos terminais não redutores com anel piranosídico. Essas foram expostas sob hidrólise ácida parcial, após remoção de unidades de arabinofuranose das posições

TABELA IV

COMPOSIÇÃO MOLAR PERCENTUAL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS, ANALISADOS POR g.l.c.\* E g.l.c-m.s\*\*, DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO DE P, EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE (Cl<sup>-</sup>).

Fragmentos de Acetatos de <u>O</u> -Metil Alditóis	Frações (moles%)	
	F-2	F-3
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	40,8	38,6
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara	-	6,5
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	1,1	10,2
2,4-Me <sub>2</sub> -Ara	-	1,9
3-Me-Ara	6,5	3,9
Pentitol	16,9	10,2
3,4-Me <sub>2</sub> -Rha	-	-
2-Me-Rha	7,0	4,9
3-Me-Rha	0,8	1,4
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Fuc	-	-
3-Me-Fuc	2,8	0,9
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	0,9	-
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	5,1	5,3
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	15,1	13,8
6-Me-Gal	2,4	1,6
3,4-N-Me <sub>2</sub> -Gal	0,5	-
3,4,6-N-Me <sub>3</sub> -Gal	-	0,6

\* Nas colunas A e B;

\*\* Na coluna G

TABELA V

COMPOSIÇÃO MOLAR PERCENTUAL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS, ANALISADOS POR g.l.c.\* E g.l.c-m.s.<sup>▲</sup> DOS POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS DE FOLHAS DE PERESKIA ACULEATA.

Fragmentos de Acetatos de O-Metil Alditóis	Amostras (moles%)				
	P	P <sup>o</sup>	P <sup>●</sup>	P-1	FA <sup>o</sup>
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara	-	-	-	0,1	5,2
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	20,0	21,0	14,0	-	13,0
3,5-Me <sub>2</sub> -Ara	0,9	1,0	5,0	0,1	5,2
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	0,6	0,5	4,0	-	9,0
3-Me-Ara	9,3	7,6	15,0	-	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	-	-	9,0	3,7	3,9
3,4-Me <sub>2</sub> -Rha	-	-	-	-	9,0
2-Me-Rha	1,9	2,8	5,2	-	-
3-Me-Rha	5,2	7,8	7,5	12,8	15,6
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	2,3	4,0	6,5	10,1	11,7
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	14,0	19,2	15,0	57,5	7,8
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	3,7	0,3	5,1	-	-
2,6-Me <sub>3</sub> -Gal	31,6	25,6	13,7	2,4	7,8
3,6-Me <sub>2</sub> -Gal	-	-	-	0,4	5,2
2,3-Me <sub>2</sub> -Gal	-	0,8	-	0,9	6,5
2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	-	0,4	-	-	-
2-Me-Gal	-	1,2	-	-	-
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glu	3,7	0,1	-	0,3	-

\* Nas coluna A e B;

▲ Na coluna E, acoplada a m.s.;

o Metilado, carboxi-reduzido;

● Metilado, carboxi-reduzido, remetilado.



0-2 e 0-4. A presença de Araf substituída em 0-2 (0,9%) em P, foi verificada, conforme indicam os dados da Tabela V.

A estrutura da cadeia principal da fração F-3 e as posições nas quais ela é substituída pode ser explicada da mesma maneira que para o seu precursor o polissacarídeo P, e pode ser determinada por comparação dos dados de metilação de P (Tabela V), do produto parcialmente degradado por ácido (P-1, Tabela V), bem como dos produtos de metilação de F-3 (Tabela IV). Os fragmentos de m.s obtidos para P mostraram que unidades de galactopiranosose estão presentes como terminais não redutores (2,3%) e como estruturas 4-0- (14,0%), 3-0- (3,7%) e 3,4-di-0-substituídas (31,6%). A remoção da maioria das unidades de arabinosil originou P-1 que contém principalmente grupos terminais não redutores de galactopiranosose (10,1%), e unidades de galactopiranosose 4-0-substituídas (57,5%). Portanto, a cadeia principal do polissacarídeo P é formada por unidades de galactopiranososes interligadas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). A diminuição na proporção de unidades de galactopiranosose, 3,4-di-0 substituídas de P em relação a P-1 e os dados acima, sobre a estrutura das cadeias laterais de arabinosil, indicaram que unidades de arabinose estão ligadas ao 0-3 de unidades de  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 4) da cadeia principal, como mostra a estrutura 1<sup>124</sup> (pág.83).

Ainda, na análise de metilação foi encontrado em P-1 o derivado 2,3,4-tri-0-metilramnitol (3,7%), sugerindo que a pequena proporção de grupos terminais não redutores de ramnopiranosose foram originadas pela hidrólise ácida parcial que removeu unidades de arabinose e/ou galactose da ramnopiranosose 3,4-di-0-substituída. Em função do aumento de 5,2 para 12,8% do derivado de 3-0-metilramnitol de P comparado a P-1, sugere-se que as



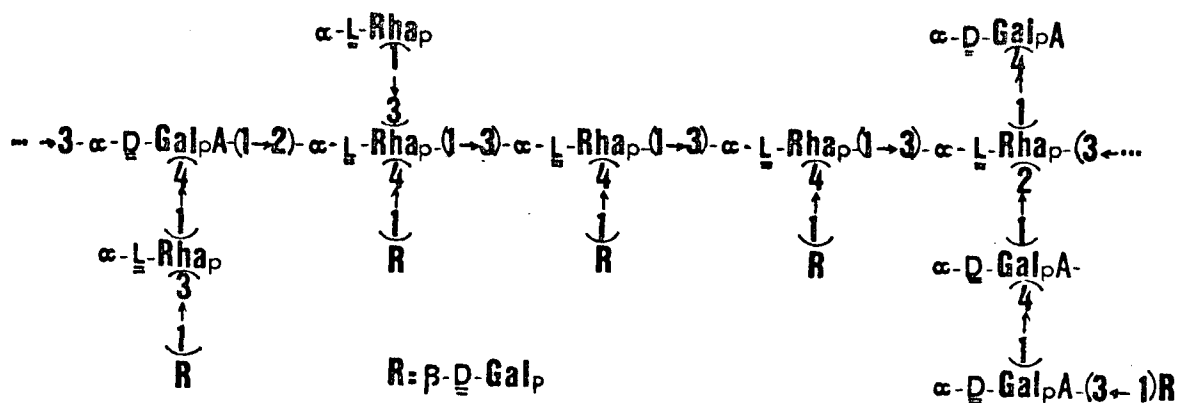
do polissacarídeo P. Isso foi confirmado pelas análises de metilação do polissacarídeo P metilado e carboxi-reduzido, ( $P^0$ ) bem como do polissacarídeo P metilado carboxi-reduzido e remetilado ( $P^\bullet$ ) (Tabela V), onde observa-se que há um aumento de 5,2% (P) para 7,5 e 7,8% (respectivamente  $P^\bullet$  e  $P^\circ$ ) do derivado 2,4-di-0-substituído de ramnopiranosose.

Por outro lado, como já foi discutido anteriormente, os espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r do polissacarídeo P (Figura 7B) da fração F-3 (Figura 6B) e do polissacarídeo P-1 (Figura 7C) apresentam, também, unidades de ácido  $\alpha$ -galacturônico interligadas (1 $\rightarrow$ 4), cujo sinal de C-1 ocorre próximo a  $\delta$  100,6, e não são representativas do núcleo da galactana.

A natureza das unidades de ácido galactopiranosilurônico em P, foi confirmada por comparação dos derivados acetatos de 0-metilgalactitóis formados no produto da metilação de P com aqueles obtidos do polissacarídeo P metilado e reduzido com  $\text{LiAlH}_4$ , para transformar os grupos  $\text{CO}_2\text{Me}$  a  $\text{CH}_2\text{OH}$  (polissacarídeo  $P^0$ ). Como pode ser visto na Tabela V, a carboxi-redução ocasionou o aparecimento de 2-0-Me; 2,3 e 2,4-di-0-metil derivados, que correspondem às unidades de ácido galacturônico 3,4-di-0; 4-0 e 3-0-substituídas. Isso poderia sugerir a presença de unidades de ramnopiranosose intercaladas entre as unidades de ácido galacturônico, conforme sugerido na estrutura 2 e, também, proposta pelos resultados de P metilado, carboxi-reduzido e remetilado ( $P^\bullet$ , Tabela V).

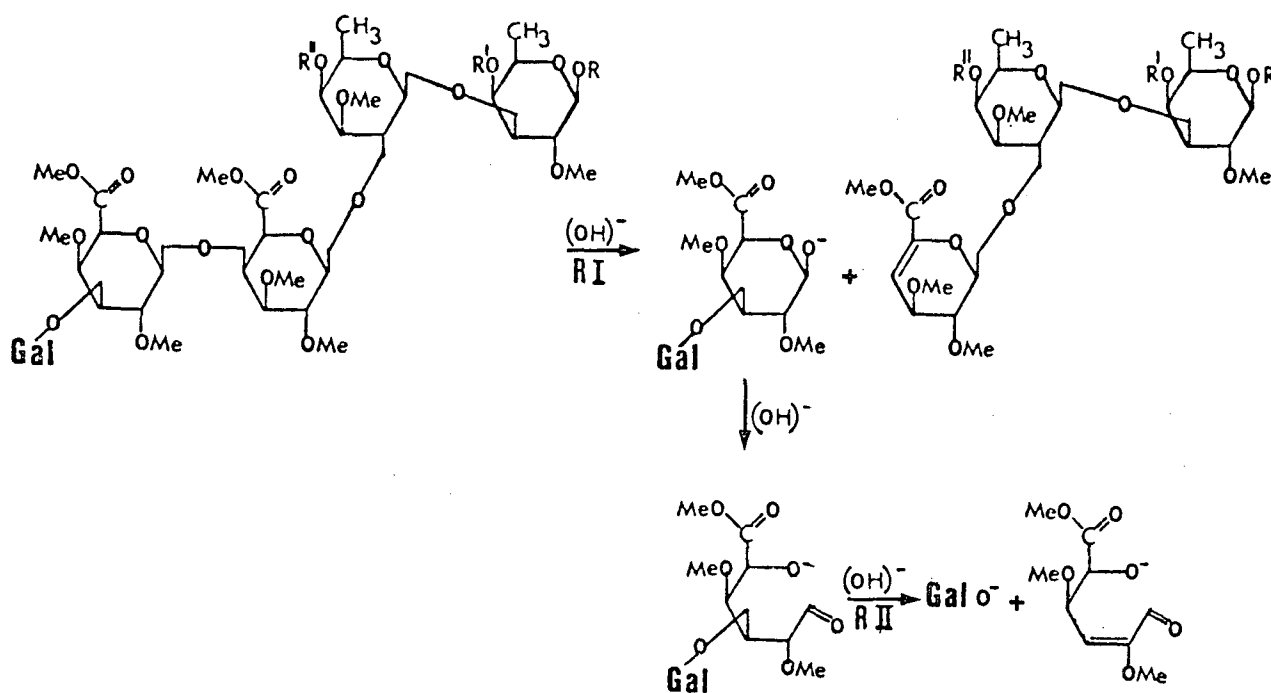
As discrepâncias na razão molar dos açúcares metilados das frações F-2 e F-3 (Tabela IV) em relação aos acetatos de alditóis dessas mesmas frações (Tabela II) podem ser atribuídas

ã  $\beta$ -eliminação causada por base forte usada durante a metilação.



Estrutura 2

Esse é um fenômeno que tem sido relatado na metilação de polissacarídeos acídicos<sup>15,22,93,104,128</sup> e que pode ocorrer tanto através das unidades de ácido urônico, como através das unidades redutoras liberadas em meio alcalino, conforme o seguinte esquema:



Esquema de  $\beta$ -eliminação

Assim, observamos que a unidade de ácido galacturônico removida de O-4 do GalpA apresenta um grupo redutor não substituído (R I), que, na forma de cadeia aberta, em solução aquosa de NaOH (metilação de HAWORTH) é  $\beta$ -eliminada. Durante o mesmo processo pode ocorrer, também, a remoção do substituinte da posição O-3 (arabinose, galactose ou acetil) produzindo um derivado de ácido galacturônico insaturado (R II). Portanto, a unidade do ácido urônico é convertida, após  $\beta$ -eliminação, em um produto insaturado (absorção a 232 nm) que hidrolisado, reduzido e acetilado no sistema analisado, não é detectado por g.l.c-m.s, como acetato de alditol parcialmente metilado.

Na análise por metilação da fração F-3 (Tabela IV) observou-se, ainda que muitas das unidades de ramnose 2,4-di-O-substituídas não estão localizadas na mesma posição relativa das unidades de ramnose 3,4-di-O-substituídas, em razão da menor degradação do derivado 2-O-Me-Rha.

A análise através da degradação alcalina do polissacarídeo P, (Materiais e Métodos item 3.2.8) serviu, também, para caracterizar a ligação glicosídica entre a hidroxiprolina e a arabinose pela detecção desse aminoácido por t.l.c, e de arabinitol penta-acetato por g.l.c-m.s (Figuras 8A-8B). Esse tipo de ligação pode ser encontrada em várias proteoarabinogalactanas vegetais<sup>33,36,88</sup>. Todavia, em função do procedimento utilizado ser um método drástico não descartamos a possibilidade de que, também, outros aminoácidos e monossacarídeos possam estar envolvidos em ligações glicosídicas.

A presença do ácido urônico na forma de éster metílico é importante para explicar a degradação das amostras através da

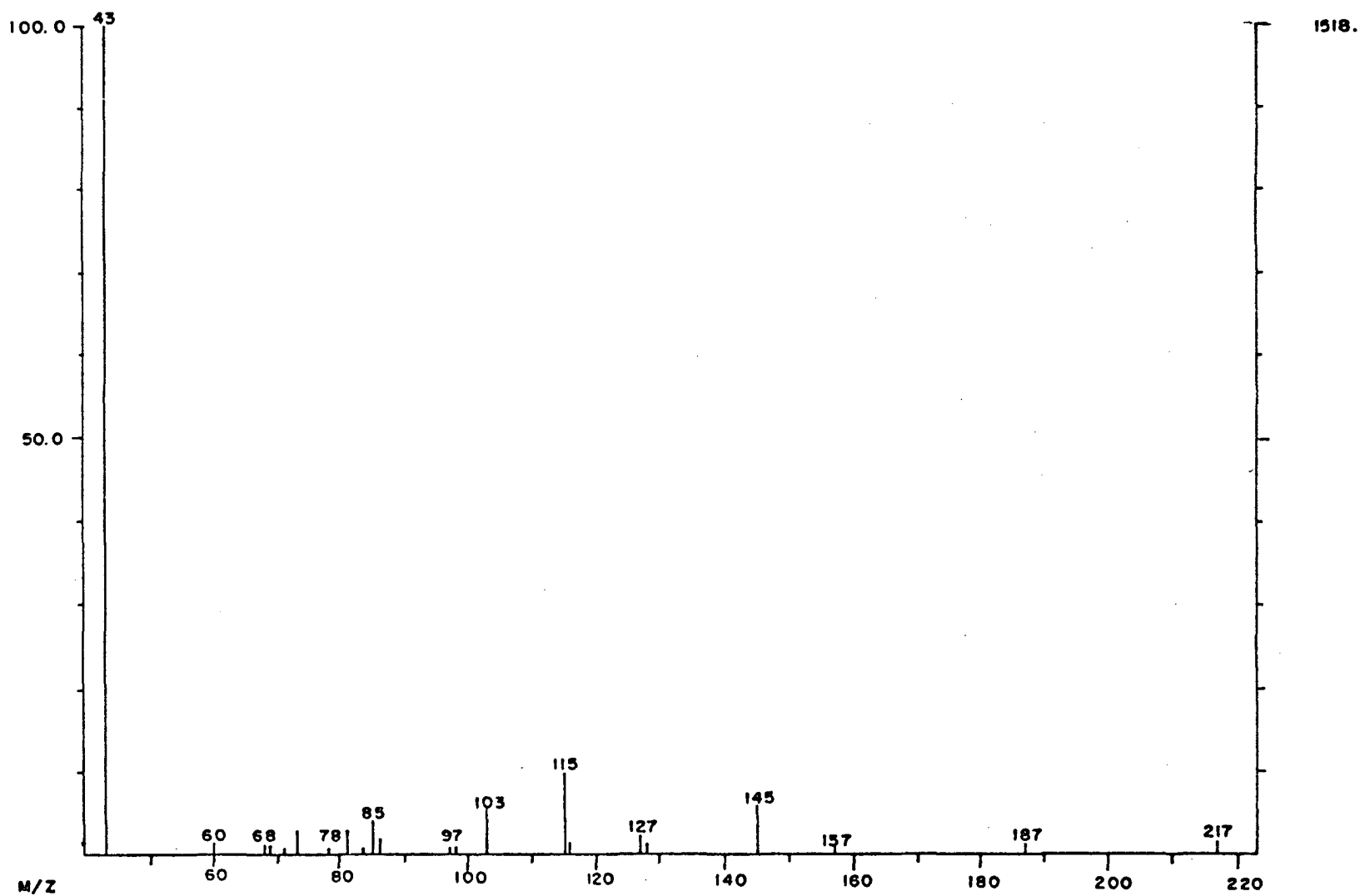
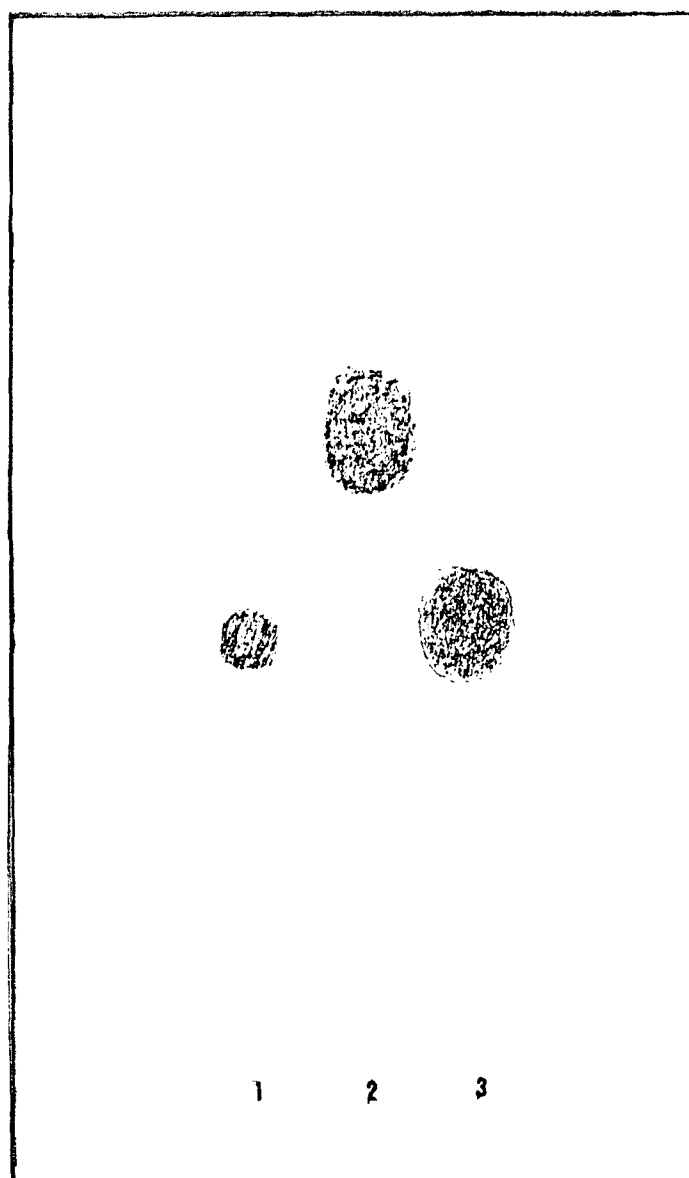


Fig. 8A - Espectro de massa (impacto eletrônico) do arabinitol penta-O-acetato, produto do polissacarídeo P, após degradação alcalina.



**Fig. 8B** - Cromatograma obtido por t.l.c do produto de hidrólise ácida ( $\text{HCl } 6 \text{ M}$ , 18 h,  $105^{\circ}$ ), no solvente e visualizador C.

- 1 - Amostra do polissacarídeo P, após degradação alcalina;
- 2 - Padrão de prolina;
- 3 - Padrão de hidroxiprolina.

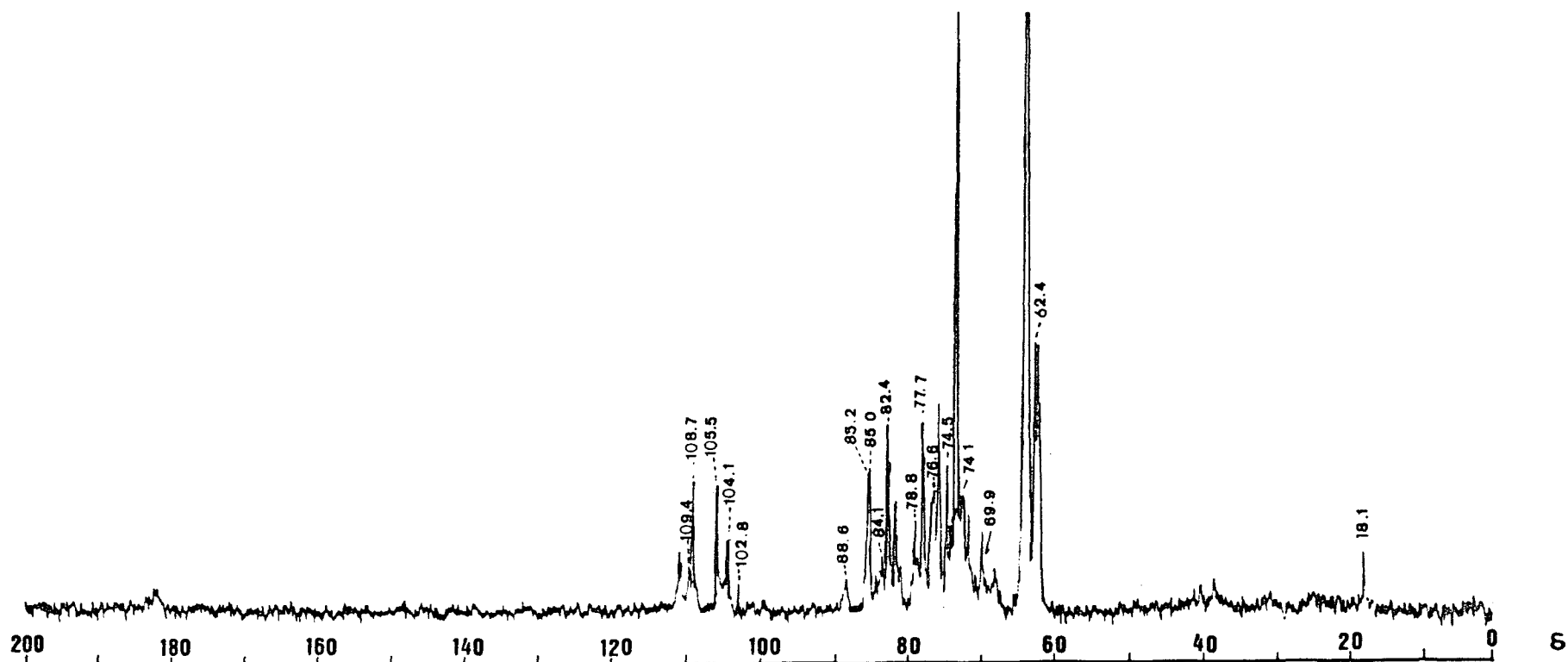


Fig. 9 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r de  $\text{P}_\beta$ , em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.



$\beta$ -eliminação que pode ocorrer durante a fase de metilação. Essa degradação foi estudada no polissacarídeo P, utilizando-se como solvente a etilenodiamina e como base o lítio metálico<sup>101,102</sup>. Observou-se, então que cerca de 64,5% do polímero original P foi  $\beta$ -eliminado formando o resíduo  $P_\beta$ . Esse foi então analisado como acetatos de alditóis (Tabela II) e apresentou ramnose: arabinose: galactose: ácido galacturônico, respectivamente, na seguinte relação molar 1,5: 6,4: 6,0: 1,0. O espectro de  $^{13}\text{C}$  de  $P_\beta$  apresentado na Figura 9 é muito semelhante ao da fração F-7 (Figura 6C) sugerindo que ambas as amostras apresentam estruturas semelhantes. Comparando-se o espectro de  $^{13}\text{C}$  de  $P_\beta$  (Figura 9) com o do polissacarídeo original (Figura 7A-7B) e com os das frações F-2 e F-3 (Figuras 6A-6B), observa-se que houve degradação, por  $\beta$ -eliminação, principalmente na região de carbono anomérico das unidades de arabinofuranose e galactopirano se. Para o espectro da Figura 9 ( $P_\beta$ ), relacionando-se as áreas dos sinais na região do  $\text{CH}_3$  ( $\delta$  18) de 6-deoxiaçúcar e de C-1 de ácido galacturônico ( $\delta$  102,8), a análise quantitativa indica que a área do sinal equivalente ao C-1 do ácido galacturônico corresponde a 61,4 moles% em relação ao  $\text{CH}_3$  do deoxiaçúcar. Transportando-se esses resultados à percentagem de ramnose em  $P_\beta$  (10 moles%, Tabela II) observa-se que as análises de  $^{13}\text{C}$  e de g.l.c para essas unidades são equivalentes.

#### 4.7 LOCALIZAÇÃO DOS GRUPOS O-ACETÍLICOS NO POLISACARÍDEO P<sup>125</sup>.

O estudo da localização de grupos O-acetílicos é impor-

tante tanto do ponto de vista estrutural como do imunológico. Por outro lado a distribuição de monossacarídeos terminais e de seus substituintes pode contribuir para a classificação taxonômica e estar relacionada com a especificidade.

Em *S. typhimurium* foi comprovado que grupos O-acetílicos ligados ao O-2 de unidades de D-galactose, atuam como determinantes constituindo o fator de antigenicidade 5-O<sup>54</sup>. Em *Klebsiella* O, grupo 9, esses substituintes, foram encontrados nas posições O-6 e O-2,6 das unidades de galactose<sup>90</sup>.

Do ponto de vista estrutural observa-se que a adição de grupos O-acetílicos em um polissacarídeo, pode ocasionar significativas modificações na sua estrutura secundária e terciária. Esses efeitos foram relatados em polissacarídeos extracelulares produzidos por *Arthrobacter viscosus* e *Pseudomonas elodea*<sup>105</sup>. Assim, a remoção desses substituintes pode estimular um estudo sobre o papel dos mesmos no controle das propriedades funcionais do polissacarídeo, futuramente.

O heteropolissacarídeo P apresentou pela dosagem química<sup>70</sup>, por análise de ácido acético (g.l.c) e por <sup>1</sup>H-n.m.r (Figura 5) ~7 g% de grupos O-acetílicos em relação ao açúcar total. Esse percentual relacionado ao peso equivalente do polissacarídeo, extraído dos dados da Tabela II, indicou que 25 moles% são substituídos por O-acetil, cuja localização passaremos a discutir.

A primeira tentativa para se localizar grupos O-acetílicos no polissacarídeo P foi realizada pelo método de deBELDER e NORRMAN<sup>45</sup>, no qual foi empregado o metil vinil éter, na primeira etapa de O-substituição dos grupos hidroxílicos livres.

Todavia, esse experimento não foi bem sucedido. O método de BOUVENG<sup>25</sup> mostrou-se superior para o polissacarídeo em estudo. Nesse último, a amostra foi solubilizada em DMF para a etapa sequencial de fenilcarbamoilação com fenilisocianato, a qual foi mais eficiente quando a piridina a 50<sup>o</sup>, foi empregada como solvente. As etapas seguintes de de-O-acetilação, O-metilação, remoção dos grupos fenilcarbamato com íon metil sulfinil carbanion, e hidrólise ácida foram realizadas pelo método modificado por CORRÊA et alii<sup>38</sup>. A mistura resultante, contendo aldoses e O-metil aldoses, foi reduzida, acetilada e os produtos na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por g.l.c-m.s .

A melhor eficiência na separação dos derivados foi alcançada empregando-se as colunas capilares de OV-17 + OV-225(1:3) e DB-210. A coluna de DB-210 foi utilizada pois possibilitou a separação de todos os derivados de O-metilarabinitol acetato, o que não ocorre em outras colunas<sup>125</sup>. Assim, os tempos de retenção detectados na coluna de DB-210 para os derivados acima referidos estão apresentados na Tabela VI.

Na metodologia empregada para a localização dos substituintes O-acetílicos, os vários O-metil derivados obtidos indicam a posição desses substituintes no heteropolissacarídeo. Através dos dados da Tabela VII, eles correspondem a acetatos de arabinitol 3-O(12%) e 2,3,5-tri-O-Me (2%); acetatos de ramnitol 2-O(1%) e 3-O-Me(11%) e acetatos de galactitol 2-O(3%), 3-O(1%), 6-O(1%) e 2,3-di-O-Me (1%). Foram, também, detectados arabinitol penta-acetato (40%), ramnitol penta-acetato (10%) e galactitol hexa-acetato (16%). Com esses resultados parece claro que as unidades

TABELA VI

TEMPO DE RETENÇÃO DE O-METILARABINITOL ACETATOS, OBTIDOS DO POLISSACARÍDEO P, EM COLUNA CAPILAR (DB-210) A 195<sup>0</sup>.

<u>O</u> -Metil-derivado	R <sub>t</sub> <sup>*</sup>
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Rib	1,00
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	1,03
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara	1,08
3,5-Me <sub>2</sub> -Ara	1,37
2,4-Me <sub>2</sub> -Ara	1,60
3,4-Me <sub>2</sub> -Ara	1,67
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	1,68
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	1,75
5-Me-Ara	1,88
2-Me-Ara	2,24
3-Me-Ara	2,39

\* R<sub>t</sub>, tempo de retenção relativo ao 1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metilribitol. Sob estas mesmas condições os R<sub>t</sub> de 2-O; 3-O e 2,3-di-O-metilxilitol acetatos são 2,50; 2,47 e 1,74, respectivamente.

TABELA VII

IDENTIFICAÇÃO E PERCENTAGEM DE ACETATOS DE ALDI - TÓIS PARCIALMENTE METILADOS NO POLISSACARÍDEO P ATRAVÉS DE: 1. ANÁLISE DE METILAÇÃO CONVENCIONAL; 2. LOCALIZAÇÃO DE O-ACETIL PELO MÉTODO DE BOUVENG MODIFICADO POR CORRÊA et alii; 3. INTRODUÇÃO DE O-CD<sub>3</sub> NO LUGAR DE GRUPOS O-ACETÍLICOS.

<u>O</u> -Me-derivados <sup>o</sup>	Moles% e procedimentos		
	▲ 1	2*	3*
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	20	2	30
3,5-Me <sub>2</sub> -Ara	1	-	5
2,3-Me <sub>2</sub> -Rha	-	-	2
2-Me-Rha	2	1	7 <sup>●</sup>
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	1	-	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	2	-	2
3-Me-Rha	5	11	-
3-Me-Ara	9	12	8
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	14	-	20
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	4	-	5
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	4	-	-
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	32	1	21
2,3-Me <sub>2</sub> -Gal	-	1	-
6-Me-Gal	-	1	-
2-Me-Gal	-	1	-
3-Me-Gal	-	1	-
Rha	-	10	-
Ara	-	40	-
Gal	-	16	-

<sup>o</sup> Ordem de emergência em coluna de OV-17 + OV-225, 1:3;

▲ Usando a coluna de OV-17 + OV-225, 1:3;

\* Usando a coluna de DB-210;

● Não contém "satélite".

de ramnopirranose, que estão principalmente substituídas em 0-2, 4 no polissacarídeo P, apresentam uma alta proporção de grupos 0-acetílicos na posição 0-3(11%).

A distribuição precisa desse substituinte nas unidades de arabinose e galactose, não foi possível evidenciar em função do processo de  $\beta$ -eliminação que pode ter ocorrido durante a fase de metilação. Quanto às unidades de ácido galacturônico, as mesmas não foram detectadas por g.l.c-m.s. Todavia os resultados obtidos serviram para conduzir o experimento seguinte visando determinar a sua exata localização. Com esse propósito, o polissacarídeo P foi dissolvido em DMSO e convertido em seu derivado fenilcarbamato, que foi sucessivamente de-0-acetilado, usando-se metóxido de sódio metanólico, e deuterometilado, com  $\text{Ag}_2\text{O}$  em DMF contendo  $\text{CD}_3\text{I}$ . O grupo fenilcarbamato foi removido e o polissacarídeo resultante submeteu-se à análise de metilação convencional. Com essa metodologia foi possível obter-se resultados de metilação mais próximos dos obtidos para o polissacarídeo P (Tabela VIII e Figura 10).

A ausência de 3-0-metilramnitol pode ser explicado pelo aparecimento do 2,3-di-0-metilramnitol, que pode ser oriundo da reação de  $\beta$ -eliminação do ácido galacturônico ligado ao 0-2 da ramnose (ver esquema a seguir). Sabe-se que a  $\beta$ -eliminação se processa em duas etapas e que, em RII (Página 98), a unidade galacturonosil insaturada é eliminada, por um mecanismo ainda não elucidado<sup>97</sup>.

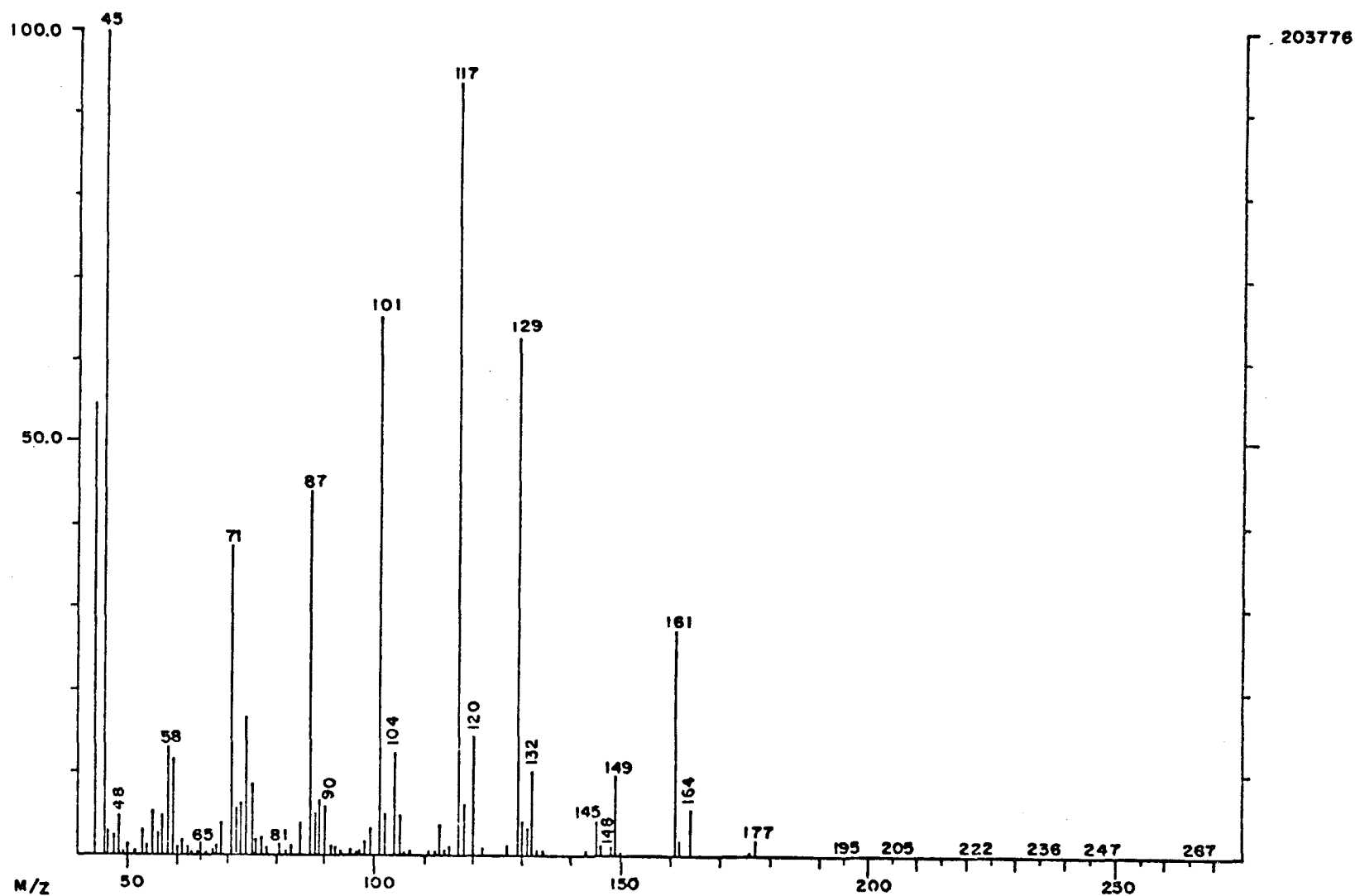


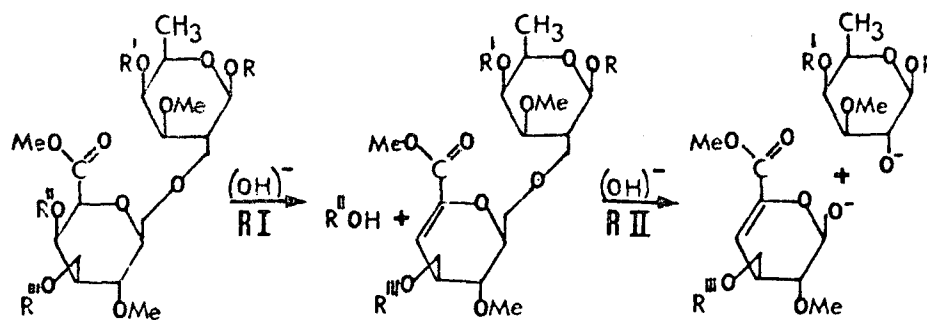
Fig. 10 - Espectro de massa (impacto eletrônico) do 2,3,5-tri-O-metilarabinitol, com seus fragmentos satélites contendo  $CD_3I$  (massa + 3.u.m.a.), cujos m/z aparecem escritos na vertical.

## TABELA VIII

ESPECTROMETRIA DE MASSA DE O-METILALDITÓIS ACETATOS E DE SEUS SATÉLITES, CONTENDO + 3 U.M.A. RESULTANTES DA PRESENÇA DE UM GRUPO  $\text{OCD}_3$  NO POLISSACARÍDEO P

<u>O</u> -Metil-derivado	Percentagem do satélite em relação à combinação do tamanho do satélite e o seu progenitor
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	45 (48; 5%), 87 (90; 12%), 101 (104; 16%), 117 (120; 13%), 129 (132; 14%), 145 (148; 22%), 161 (164; 19%).
3,5-Me <sub>2</sub> -Ara	45 (48; 3%), 87 (90; 19%), 101 (104; 16%), 129 (132; 23%), 161 (164; 17%), 189 (192; 22%).
2,3-Me <sub>2</sub> -Rha	71 (74; 5%), 101 (104; 13%), 117 (120; 2%), 129 (132; 31%), 143 (146; 15%), 203 (206; 18%).
3-Me-Ara	87 (90; 7%), 129 (132; 8%), 189 (192; 8%).
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	45 (48; 3%), 75 (78; 11%), 101 (104; 7%), 129 (132; 16%), 205 (208; 7%).
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	45 (48; 2%), 87 (90; 12%), 101 (104; 18%), 117 (120; 7%), 129 (132; 23%), 143 (146; 23%), 161 (164; 14%), 189 (192; 24%), 203 (206; 26%), 233 (236; 9%).
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	45 (48; 3%), 87 (90; 13%), 101; 11%), 117 (120; 7%), 129 (132; 8%), 189 (192; 14%).
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	45 (48; 1%), 117 (120; 5%), 129 (132; 1%).





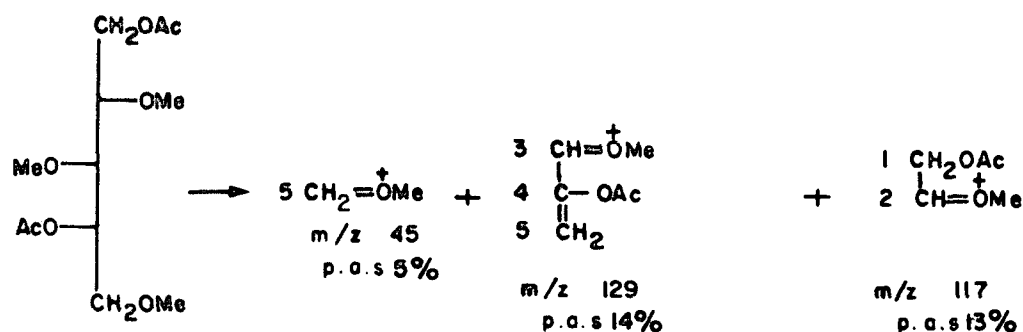
### Esquema de $\beta$ -eliminação

Estas sequências de reações podem conduzir à presença do derivado 2,3-di-O-metilramnitole indicam, também, a percentagem de ramnose ligada através de C-2 ao ácido galacturônico (2%; Tabela VII).

Na espectroscopia de fragmentação de massa apareceram picos satélites adicionais (+3 daltons) que correspondem à introdução de um grupo  $\text{OCD}_3$ . As intensidades de cada satélite aparecem na Tabela VIII com as respectivas percentagens em relação a combinação do satélite e o fragmento progenitor. As posições da O-deuterometilação correspondem, nesse processo, às de O-acetil no polissacarídeo original e podem ser determinadas usando-se o mecanismo da fragmentação estabelecido por JANSSEN et alii<sup>76</sup>.

A quantificação aproximada de O-acetil, em cada posição de uma dada unidade, foi efetuada pela determinação da percentagem de altura (p.a.s.) de cada fragmento satélite deuterado do O-metilalditol acetato, relacionado com a soma de sua altura e a do fragmento progenitor. Os valores de p.a.s. para os vários derivados presentes são esquematizados a seguir:

1,3-Di-0-acetil-2,3,5-tri-0-metilarabinitol (OMe-2,  $\bar{\sim}$ 13%; OMe-3, 14%; OMe-5; 5%).

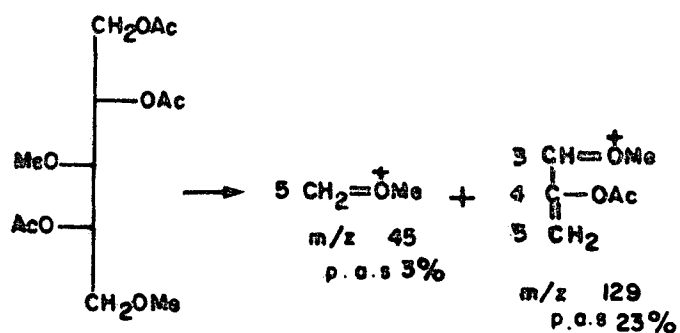


As p.a.s dos fragmentos satélites com m/z 45 (OMe-5) e com m/z 129 (OMe-3) 5% e 14%, respectivamente, concordam com o valor de 19% observado para o fragmento 161 (OMe-3,5).

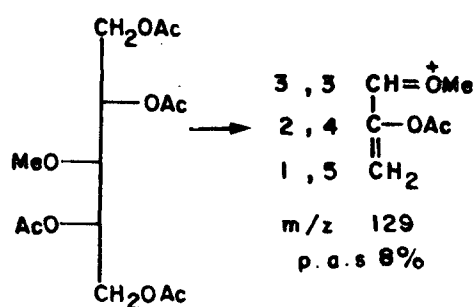
A p.a.s do fragmento satélite com m/z 117 (13%) pode ser atribuída ao OMe-2, se for assumido que o impacto eletrônico (i.e.), quebra a molécula entre os átomos C-2 e C-3 e não entre C-4 e C-5. Entretanto, a ausência de 2-0-metilarabinitol a cetato, detectado no experimento preliminar de localização de grupos 0-acetil, aqui não é satisfatoriamente explicada.

1,2,4-Tri-0-acetil-3,5-di-0-metilarabinitol (OMe-3, 23%; OMe-5, 3%).

As p.a.s dos fragmentos satélites m/z 45 e m/z 129, que correspondem a OMe-5 e OMe-3, são de 3% e 23%, respectivamente.

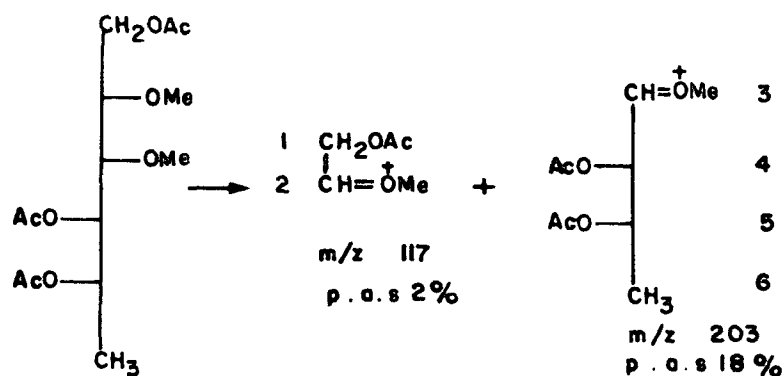


1,2,4,5-Tetra-0-acetyl-3-0-metilarabinitol (OMe-3, 8%)



O fragmento de m/z 129 corresponde à fragmentação entre os átomos C-3 e C-4 ou entre C-2 e C-3 e, portanto, contém OMe-3, onde a p.a.s do fragmento satélite é 8%.

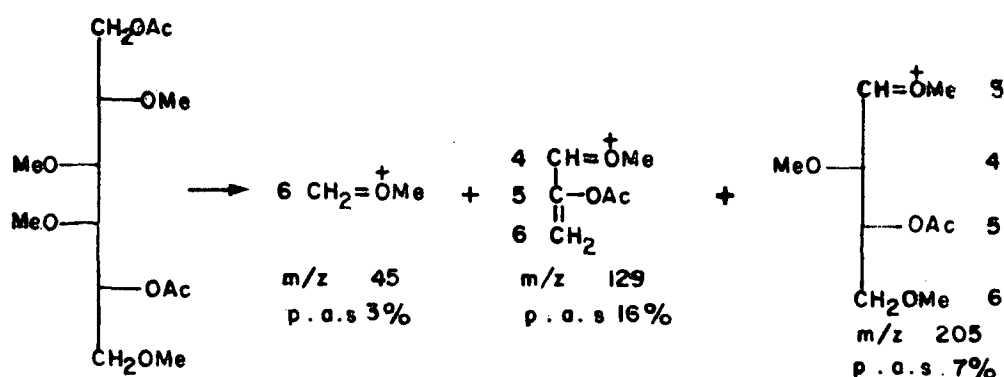
1,4,5-Tri-0-acetyl-2,3-di-0-metilramnitol (OMe-2, 2%; OMe-3, 18%).



As p.a.s dos fragmentos satélites tendo m/z 117 e m/z 203 contêm OMe-2 e OMe-3 são 2% e 18%, respectivamente.

1,5-Di-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metilgalactitol (OMe-3, 2%; OMe-4, 16%; OMe-6, 3%).

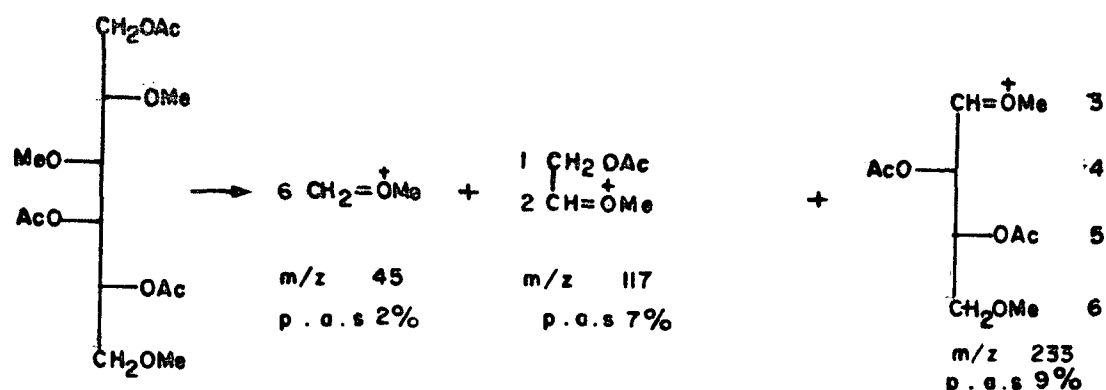
Nesse caso somente uma determinação aproximada da distribuição de deutério em grupos OMe pode ser efetuada nesse método.



Os fragmentos com m/z 45 e m/z 129 contêm grupos OMe-6 e OMe-4,6 e com p.a.s de 3% e 16%, respectivamente. O fragmento com m/z 205, que corresponde a quebra entre C-2 e C-3, tem um fragmento satélite com p.a.s de 7% e concorda com o valor combinado para OMe-4 e OMe-6, onde o de OMe-3 é aproximadamente 2%, resultante da diferença de 21% ( $7\% \times 3$ )-19% ( $3\% + 16\%$ ).

## 1,4,5-Tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilgalactitol

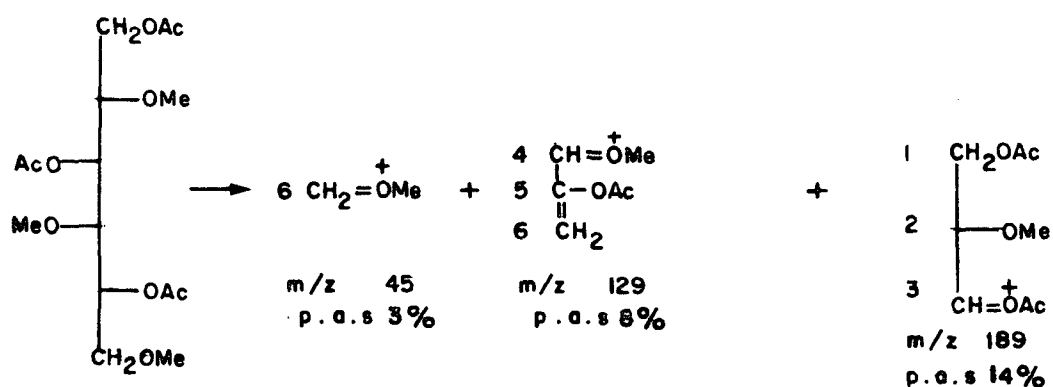
(OMe-2, 7%; OMe-3, 7% e OMe-6, 2%)



O fragmento com  $m/z$  45 tem OMe-6 e possui um fragmento satélite com p.a.s de 2%. O satélite do fragmento  $m/z$  117 poderia ser originado da quebra entre os átomos de C-2 e C-3 ou entre C-4 e C-5. A p.a.s de 7% representa o grupo OMe-2. Já o satélite do fragmento  $m/z$  233 é oriundo da quebra entre C-2 e C-3 e apresenta OMe-3 e OMe-6, cuja p.a.s para OMe-3, calculada subtraindo-se o valor de 2% (OMe-6), resultou em ~7%.

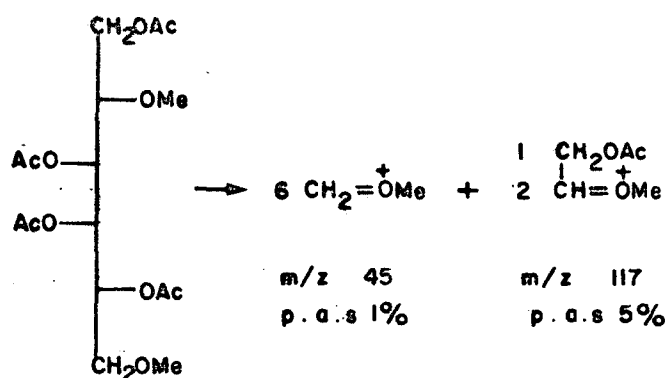
## 1,3,5-Tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metilgalactitol

(OMe-2, 14%; OMe-4, 8%; OMe-6, 3%).



As p.a.s dos satélites de fragmentos progenitores com  $m/z$  189, 129 e 45, correspondem ao OMe-2, OMe-4 e OMe-6 com uma percentagem de 14%, 8% e 3%, respectivamente.

1,3,4,5-Tetra-O-acetil-2,6-di-O-metilgalactitol  
(OMe-2,  $\approx$ 5%; OMe-6, 1%).



A p.a.s do satélite do fragmento com m/z 45 contendo OMe-6 é 1%. Em função da menor massa para o íon, a quebra entre os átomos C-2 e C-3 ocorre preferencialmente, do que entre os átomos C-4 e C-5, fornecendo o fragmento com m/z 117, que corresponde ao OMe-2, com um valor de p.a.s. calculada de 5%.

Com os resultados obtidos, nesses dois métodos desenvolvidos para distribuição de grupos O-acetílicos, fica claro que o primeiro método, usando-se piridina como solvente, forneceu muitos detalhes da localização desses substituintes em várias unidades da estrutura do heteropolissacarídeo. Ao invés de estarem localizados em uma única posição de cada unidade, eles encontram-se ligados a vários oxigênios das unidades monossacáridicas diferentes, com excessão, para as unidades de arabinopirranose e ramnopirranose 2,4-di-O-substituídas onde aparecem somente como 3-O-acetato.

Contudo permanece a incôgnita: seriam os grupos O-acetílicos localizados em diferentes posições na biossíntese do polissacarídeo vegetal ou ocorreriam primeiramente numa única posição e posteriormente sofreriam migração?

#### 4.8 ANÁLISE DA VISCOSIDADE

O esclarecimento das razões pelas quais um organismo é levado a sintetizar macromoléculas tão complexas e específicas, muitas vezes sob um comando genético aprimorado, é que tem motivado a investigação da estrutura fina desses polímeros. Por outro lado, em razão da extensão das características funcionais exibidas pelos polissacarídeos, e que determinam muitas das suas propriedades reológicas, combinações de polímeros são com frequência utilizadas para obter uma determinada função. Como a miscibilidade de polímeros em solução aumenta com a diminuição da concentração de cada um e, é rara em altas concentrações, no exemplo do polissacarídeo P, naturalmente constituído por mais de uma unidade polimérica, esse comportamento em solução foi analisado, também, em termos de viscosidade.

Para o polissacarídeo P de *P. aculeata*, foi observado que os valores de viscosidade mais alta ocorrem na faixa de pH 4,4 a 5,6 (Figura 11A). Esse resultado pode ser decorrente da existência de grupos carboxílicos dissociados que, nessa faixa de pH, podem apresentar o efeito repulsivo de cargas com o mesmo sinal (força coulombiana). Ocorrendo a repulsão a cadeia do polissacarídeo se estende e pode existir um aumento na capacidade de interação com a água, bem como a formação de pontes de hidrogênio intermoleculares. Observa-se, na prática, que os grupos carboxílicos tendem a se ionizar em pH acima de 4. Abaixo de pH 3,0 a concentração hidrogeniônica aumenta e a manutenção

dos grupos carboxílicos ionizados é reprimida<sup>103</sup>. No polissacarídeo P esses grupos ácidos podem ser oriundos tanto das unidades de ácido urônico não esterificadas, bem como de grupos fosfato, desde que os íons fosfato, fortemente ácidos, e que estão presentes na amostra (0,5 g%, Tabela I), também mantêm a carga iônica, até mesmo em baixos valores de pH; o que então permite à molécula um alto grau de hidratação<sup>139</sup>. Como a viscosidade intrínseca é dependente da forma da molécula e da sua capacidade de hidratação, ela pode ser interpretada como uma medida de força da interação entre os solutos e o solvente<sup>103</sup>.

A adição de cátions monovalentes ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) em diferentes concentrações molares tendem a diminuir a viscosidade da solução (Figuras 11B-11C) em função do aumento da força iônica e da competitividade entre os íons e a(s) molécula(s), que interagem com o solvente. A alteração na viscosidade relativa pode ser decorrente de uma modificação na estrutura terciária da(s) molécula(s), que por sua vez influencia a viscosidade intrínseca. A presença de íons pode fazer com que haja uma maior interação partícula-partícula decorrente da menor interação do(s) polímero(s) com a água<sup>30</sup>.

Quanto aos ânions monovalentes  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$  (ânions da série de Hofmeister), os que alteram a viscosidade no sentido de menor decréscimo são  $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$  e, como os íons positivos acima descritos, também, podem conduzir a uma modificação da estrutura terciária<sup>58,96,100</sup>. Muitos são os exemplos nos quais a adição de eletrólitos à amostra pode ocasionar formas e tamanhos diferentes que afetam diretamente a viscosidade das soluções. Outro efeito foi observado fornecendo-se energia calorífica que



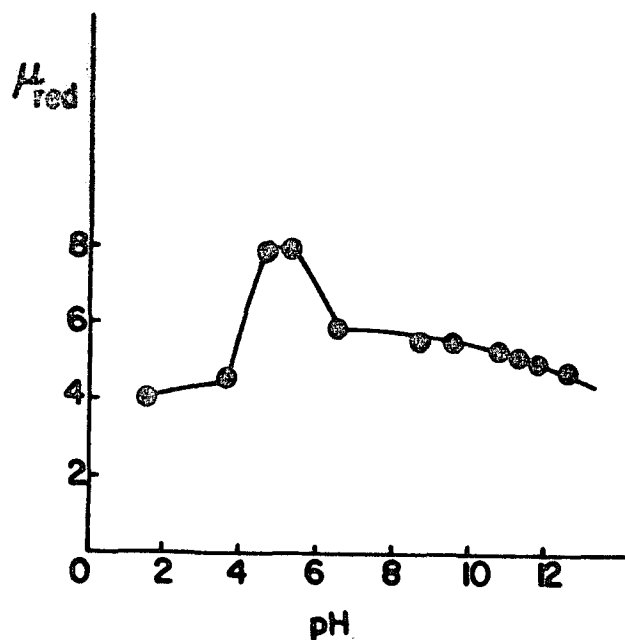


Fig. 11A - Efeito do pH sobre a viscosidade reduzida do polissacarídeo P, da mucilagem de *Pereskia aculeata*, a 25<sup>o</sup>.

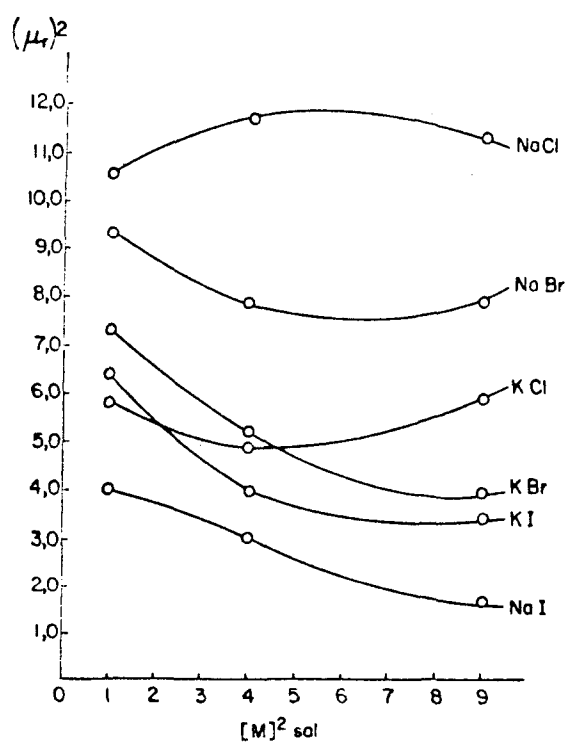


Fig. 11B - Efeito da adição de eletrólitos, em diferentes molaridades, sobre a viscosidade relativa do polissacarídeo P, da mucilagem de *Pereskia aculeata*, a 25<sup>o</sup>.

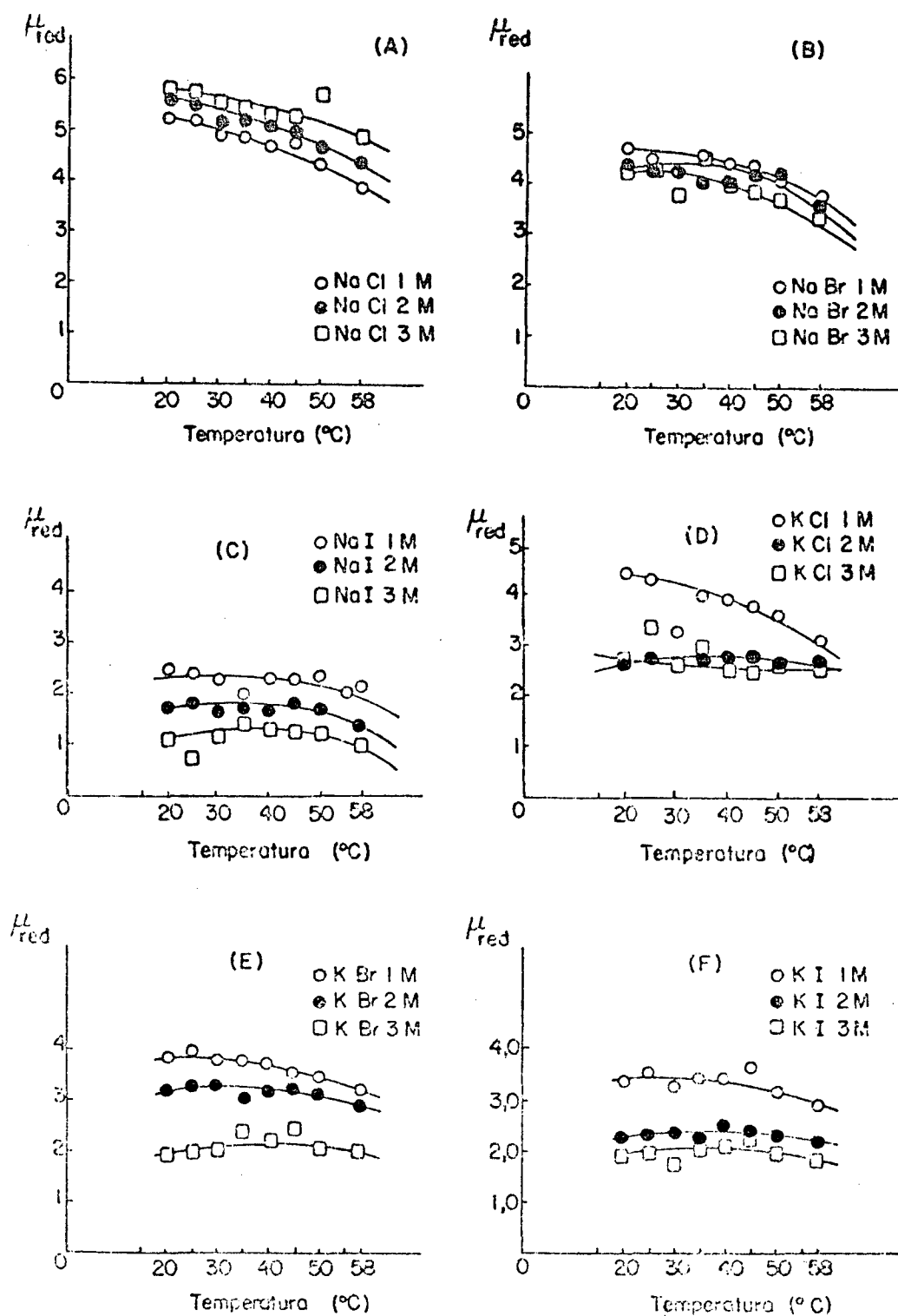


Fig. 11C - Efeito da adição de eletrólitos, em diferentes molaridades, sobre a viscosidade reduzida do polissacarídeo P, da mucilagem de *Pereskia aculeata*, 25 .

condiciona valores de viscosidade bem pouco diferentes dos obtidos a 25° (figura 11D)<sup>65</sup>.

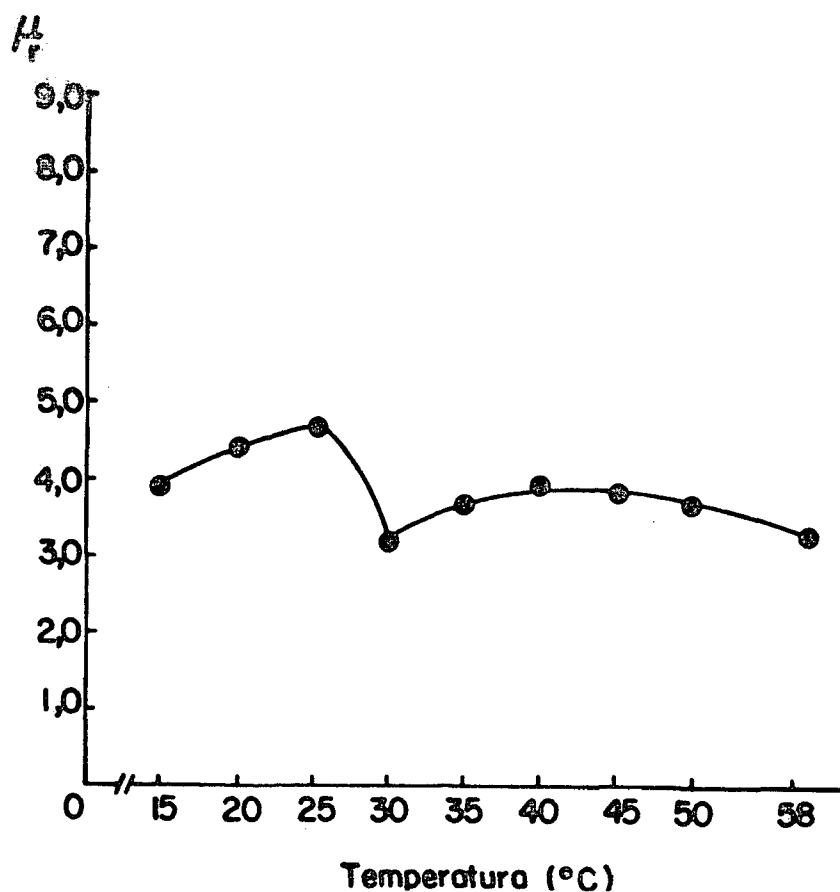


Fig. 11D - Efeito da variação da temperatura sobre a viscosidade relativa do polissacarídeo P, da mucilagem de *Pereskia aculeata*.

Nos estudos da viscosidade intrínseca o polissacarídeo P em solução aquosa, apresentou um valor bastante alto quando comparado a outras proteoglicanas<sup>33</sup>. Esse resultado pode advir da forma e da flexibilidade dos substituintes na macromolécula, desde que eles têm a propriedade de influenciar no seu comportamento físico-químico quando em soluções aquosas. Sabe-

se que parâmetros como tipo de ligação dos substituintes, sequência de unidades, grau de ramificação do(s) polímero(s), conteúdo de ácido urônico e de acetyl ocasionam diferentes viscosidades para os polissacarídeos<sup>41</sup>.

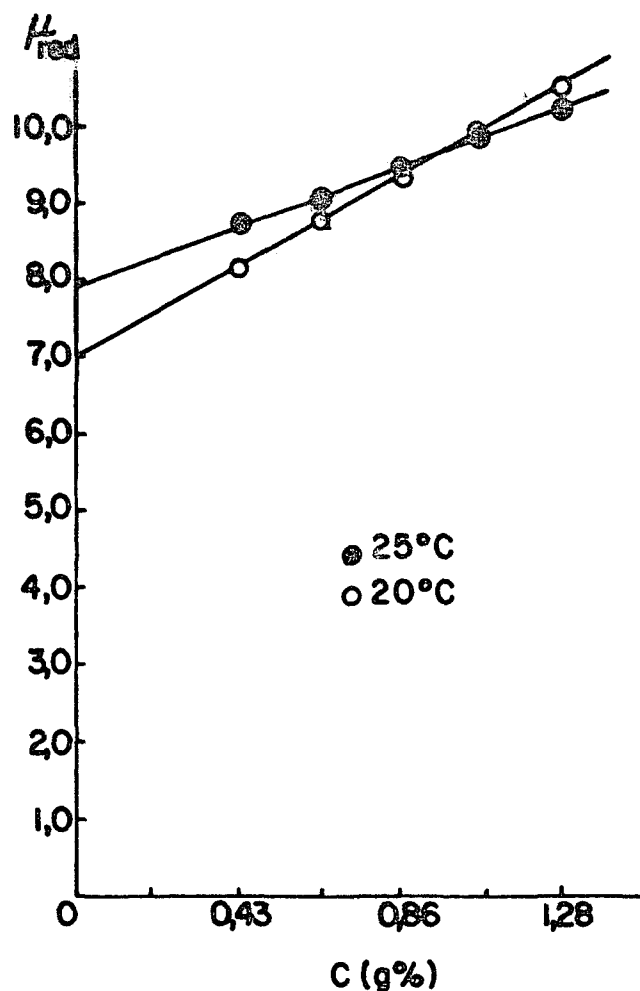


Fig. 11E - Determinação da viscosidade intrínseca do polissacarídeo P, da mucilagem de *Pereskia aculeata*.

Avaliando os resultados da (Figura 11E), observamos que o polissacarídeo P a 1% em água resultou em uma solução com uma viscosidade de 1000 centipoises a 25<sup>o</sup>. Polissacarídeos de goma gatti, goma de tragacante, goma de locust bean, goma arábica

arabinogalactana de larix, algumas carragenanas e alguns derivados de alginato, nas mesmas concentrações e temperatura, apresentam viscosidade menores (máximo 750 cps)<sup>58,114</sup>. A solução do polissacarídeo P somente apresenta viscosidade inferior quando comparada ao alginato de amônio (2000 cps), goma de karaya (3000 cps), goma de guar (4500 cps) e certos tipos de carragenanas (1420 cps)<sup>114</sup>.

## CONCLUSÕES

1. O pó acetônico de folhas verdes submetidos à extração com água a 50° deu origem à mucilagem de folhas *Pereskia aculeata* com um rendimento de 11,8%. Após o tratamento de SEVAG foi denominado polissacarídeo P, que é constituído por um complexo a rabinogalactana-proteína, com a seguinte relação molar: 5,1: 8,2: 1,2: 1,0, respectivamente para os monossacarídeos arabinose: galactose: ramnose: ácido galacturônico; contém, também, cálcio, fosfato, hexosamina, metoxil e acetil.

2. A separação do polissacarídeo P em 3 principais frações por cromatografia em DEAE-celulose e suas análises por espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ , bem como a cromatografia em gel de Sephadex da molécula colorida com Azul de Procion M-3G, indicaram que o polissacarídeo P é polidisperso.

3. Nos espectros de  $^{13}\text{C}$  das três principais frações obtidas em DEAE, F-2, F-3 e F-7, os sinais bem definidos entre  $\delta$  62,2-62,7 indicam que o C-6 dos grupos galactosil terminais, bem como os da cadeia interna não estão substituídos, confirmando os dados de metilação.

4. A análise por  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. das frações F-2, F-3 e F-7

em  $D_2O$  indicaram os mesmos sinais observados no espectro do polissacarídeo P em DMSO. Isso demonstrou que o tratamento de SEVAG do polissacarídeo P não removeu toda a proteína não covalentemente ligada com a maioria do polissacarídeo, formando um complexo altamente viscoso semelhante à interação entre carbohidrato-lectina. Assim, após passagem em DEAE-celulose, originaram-se polissacarídeos não complexados, que apresentam movimentos moleculares elevados das cadeias laterais de arabinose. O espectro de  $^{13}C$  do polissacarídeo P em  $DMSO-d_6$  foi bem mais definido que em  $D_2O$ , observando-se que alguns dos sinais de  $\alpha$ -Araf aparecem sobrepostos aos oriundos do(s) núcleo(s) do complexo, cujo movimento molecular é limitado.

5. Os resultados dos espectros de  $^{13}C$  do polissacarídeo P e de P-1, bem como de seus produtos de metilação, indicaram que o(s) núcleo(s) do(s) polissacarídeo(s) são formado(s) por uma galactana  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), que apresenta algumas unidades de galactopiranosose substituídas em O-3 por unidades de arabinopiranosose 2,4-di-O-substituídas. Assim, na classificação de ASPINALL, se enquadram no grupo I como arabino-4-galactana e com tal tipo estrutura poderia ser utilizada em diferentes produtos diéticos.

6. A análise por g.l.c-m.s dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, dos oligossacarídeos ácidos (FA) metilados, carboxi-reduzidos e remetilados; do polissacarídeo metilado (P); do polissacarídeo metilado carboxi-reduzido ( $P^0$ ); do polissacarídeo metilado, carboxi-reduzido e remetilado ( $P^\bullet$ ); e de P-1 metilado demonstraram que as unidades de ácido galacturônico estão ligadas (1 $\rightarrow$ 2) às unidades de ramnose que, por sua vez, se encontram ligadas ao O-4 do ácido galacturônico, fazendo parte dos

núcleos dos polissacarídeos.

7. Os sinais a  $\delta$  100,6 nos espectros de  $^{13}\text{C}$  de P, P-1 e F-3 correspondem às unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico ligadas (1 $\rightarrow$ 4) como cadeias laterais e/ou cadeias terminais móveis, e que não são representativas dos núcleos da galactana. Em F-3, o sinal a  $\delta$  54,4 indica que o ácido galacturônico está esterificado por metanol.

8. Desde que P-1, produto da hidrólise ácida parcial de P, apresenta um valor alto para a rotação específica ( $+49^{\circ}$ ) em relação ao polissacarídeo P ( $-29^{\circ}$ ), a contribuição das unidades de arabinofuranosil removidas pela hidrólise ácida parcial é negativa e, portanto, mostra que eles têm a forma L, enquanto que a análise com galactose oxidase de P-1 indicou que as unidades de galactose têm a forma D.

9. As frações F-2 ( $-35^{\circ}$ ), F-7 ( $-37,9^{\circ}$ ) indicaram configuração  $\alpha$  e  $\beta$  respectivamente para Araf e Galp. Para a fração F-3 ( $+89,6^{\circ}$ ) o valor positivo alto pode ser decorrente do elevado conteúdo de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico (12,2 moles%).

10. A análise da ligação entre o polissacarídeo e a proteína demonstrou ligação covalente entre arabinose e hidroxiprolina.

11. As discrepâncias nas razões molares dos açúcares metilados das frações F-2 e F-3 em relação aos acetatos de aldios dessas mesmas frações são atribuídas à  $\beta$ -eliminação causada por base forte usada durante o processo de metilação. O tra-



tamento com lítio metálico comprovou o processo de  $\beta$ -eliminação onde 64,5% do polissacarídeo P foi degradado. No espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r do produto  $P_{\beta}$  verificou-se que houve  $\beta$ -eliminação principalmente na região do carbono anomérico das unidades de Araf e Galp. Também a espectroscopia por  $^{13}\text{C}$  demonstrou que a análise quantitativa de 6-deoxiaçúcares corresponde àquela verificada por g.l.c como acetatos de alditóis.

12. Para a quantificação dos grupos O-acetílicos a dosagem química foi tão eficiente quanto a espectroscopia de  $^1\text{H}$ -n.m.r. A localização de grupos O-acetílicos foi realizada pelo método de BOUVENG modificado por CORRÊA et alii, usando-se piridina como solvente, e por metilação parcial do material com iodeto de metila deuterado. Na separação dos acetatos de O-metil arabinitol por g.l.c-m.s, a coluna DB-210 provou ser a mais eficiente. Na análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados e acetatos de alditóis deuterio O-metilados, verificou-se que os grupos O-acetil encontram-se ligados a várias posições de unidades de arabinose e galactose e preferencialmente na posição O-3 da arabinopirranose e ramnopirranose.

13. Na análise de viscosidade a adição de sais em diferentes concentrações e a variação de pH condicionaram diferentes valores de viscosidade, porém inalterável com a temperatura. A viscosidade intrínseca do polissacarídeo P a  $25^{\circ}$ , em pH 4,4 - 5,6, corresponde a 790 centipoises, e deverá ser complementada com as mesmas análises sendo efetuadas em concentrações mais diluídas. Nessa sequência o estudo da viscosidade deverá ser avaliado, também, pela remoção dos substituintes O-acetil e O-metil, tanto no polissacarídeo P como na fração F-3, cujas avaliações poderão levar a uma análise comparativa com os polissacarídeos de interesse comercial, futuramente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AISAKA, K.; TERADA, O. Production of galactose oxidase by *Gibberella fujikuroi*. Agric. Biol. Chem., 45: 2311-2316, 1981.
2. ALBERSHEIM, P.; NEUKOM, H.; DEUEL, H. Splitting of pectin chain molecule in neutral solutions. Arch. Biochem. Biophys., 90:46-51, 1960.
3. ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. Scient. Amer., 232:80-94, 1975.
4. ALCANTARA; E.N.; SPECKMANN, A.E. Diet nutrition and cancer. Amer. J. Clin. Nutr., 29:1035-1040, 1976.
5. ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin. Chem., 20: 470-475, 1974.
6. ALMEIDA-FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do Valor Nutritivo do "Ora-pro-nobis" (*Pereskia aculeata* Mill). Ceres, 21,(114):105-111, 1974.
7. ANET, E.F.L.J. 3-Deoxyglycosuloses (3-Deoxyglycosones) and the degradation of carbohydrates. Adv. Carbohydr. Chem., 19:181-218, 1964

8. ASPINALL, G.O.; BEGBIE, R.; HAMILTON, A.; WHYTE, J.N.C. Polysaccharides of soy-beans, Part. III. Extraction and fractionation of polysaccharides from cotyledon meal. J. Chem. Soc. C.: 1065-1070, 1967.
9. ASPINALL, G.O.; COTTRELL, I.W.; EGAN, S.V.; MORRISON, I.M.; WHYTE, J.N.C. Polysaccharides of soy-beans. Part IV. Partial hydrolysis of the acidic polysaccharide complex from cotyledon meal. J. Chem. Soc. C.: 1071-1080, 1967.
10. ASPINALL, G.O.; HUNT, K.; MORRISON, F.M. Polysaccharides of soy-beans. Part V. Acidic polysaccharides from the hulls. J. Chem. Soc. C.: 1080-1086, 1967.
11. ASPINALL, G.O.; GESTETNER, B.; MOLLOY, J.A.; UDDIN, M. Pectic substances from lucerne (*Medicago sativa*). Part II. Acidic oligosaccharides from partial hydrolysis of leaf and stem pectic acids. J. Chem. Soc. C.: 2554-2559, 1968.
12. ASPINALL, G.O.; KHAN, R.; KING, R.R.; PAWLAK, Z. Base-catalysed degradations of carbohydrates. V. The conversion of 3-deoxyhex-2-enopyranoses into 2-furoic ester. Can. J. Chem., 51:1359-1362, 1973.
13. ASPINALL, G.O.; KRISHNAMURTHY, T.N.; FURDA, I.; KHAN, R. Base-catalysed degradation of carbohydrates. VIII. Alkaline degradation of 3,6-di-O-substituted hexoses. Can. J. Chem., 53(14): 2171-2177, 1975.

14. ASPINALL, G.O.; ROSELL, K.-G. Base-catalysed degradation of methylated acidic polysaccharides: a modified procedure for the determination of sites of attachment of hexuronic acid residues. Carbohydr. Res., 57:C 23-C 26, 1977.
15. ASPINALL, G.O. Other methods for partial depolymerization in: The Polysaccharides, vol. 1, ASPINALL, G.O. (Ed.) Academic Press, New York, 1982, p.100-131.
16. BAILEY, L.H. Manual of cultivated plants. Rev. Ed., MacMillan Co., New York, 1949, 1116p.
17. BARRETO-BERGTER, E., HOGGE, L.; GORIN, P.A.J. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditol acetates on capillary columns of OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res., 97:147-150, 1981.
18. BARRETT, A.J.; NORTHCOTE, D.H. Apple fruit pectic substances. Biochem. J., 94:617-627, 1965.
19. BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem., 234: 466-468, 1959.
20. BeMILLER, J.N. Carbanilates. Preparation and removal. Methods Carbohydr. Chem., V:400-401, 1960.
21. BEVERIDGE, R.J.; SZAREK, W.A.; JONES, J.K.N. Isolation of three oligosaccharides from the mucilage from the bark of *Ulmus fulva* (slippery-elm mucilage). Synthesis of O-(3-O-methyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-L-rhamnose. Carbohydr. Res., 19:107-116, 1971.

22. BHAT, U.R.; THARANATHAN, R.N. Fractionation of okra mucilage and structural investigation of an acidic polysaccharide. Carbohydr. Res., 148(1):143-147, 1986.
23. BIBLIA. Gêneses, 3:17-19. Português. Biblia Sagrada . Versão de Pe. Matos Soares, São Paulo, Edições Paulinas, 1978, (5<sup>a</sup> edição).
24. BITTER, T.; MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem., 4:330-334, 1962.
25. BOUVENG, H.O. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates II. Location of the O-acetyl groups in birch xylan. Acta Chem. Scand., 15:96-100, 1961.
26. BUNDLE, D.R.; LEMIEUX, R.U. Determination of anomeric configuration by n.m.r. Meth. Carbohydr. Chem., 7:79-96, 1976.
27. BURKITT, D. Economic development not all bonus. Nutrition, 11(1):6-15, 1976.
28. BURKITT, D. Food fiber. Cereal Foods World, 22(1):6-9, 1977.
29. CAPEK, P.; ROSÍK, J.; KARDOŠOVÁ, A.; TOMAN, R. Polysaccharides from the roots of the marsh mallow (Althaea officinalis L. var. Rhobusta); structural features of an acidic polysaccharide. Carbohydr. Res., 164:443-452, 1987.
30. CESÁRIO, A.; DELBEN, F.; FLAIBANI, A.; PAOLETTI, S. Po

- lyelectrolytic effects in carboxylic derivative of natural polysaccharides. Carbohydr. Res., 160:355 - 368, 1987.
31. CHIEN, J.C.W.; WISE, W.B. A  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance and circular dichroism study of the collagen-gelatin transformation in enzyme solubilized collagen. Biochemistry, 14(12):2786-2792, 1975.
32. CHURMS, S.C. Gel chromatography of carbohydrates. Adv. Carbohydr. Chem., 25:31-51, 1970.
33. CLARKE, A.E.; ANDERSON, R.L.; STONE, B.A. Form and function of arabinogalactan and arabinogalactan-proteins. Phytochemistry, 18:521-540, 1979.
34. CLARK, E.P.; COLLIP, J.B. Studies of the Tisdall method for the determination of blood serum calcium with a suggested modification. J. Biol. Chem., 63:461, 1925.
35. CONNELL, A.M. Natural fiber and bowel dysfunction. A. J. Clin. Nutr., 29(12):1427-1431, 1976.
36. COOPER, J.B., CHEN, J.A.; van HOLST, G.-J.; VARNER, J. E. Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. Tibs, 12:24-27, 1987.
37. CORRÊA, J.B.C. Estudos estruturais sobre hemiceluloses de *Mimosa scabrella* (Bracatinga). Curitiba. Tese de concurso para Professor Titular do Departamento de Bioquímica, U.F.Pr., 1986.

38. CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; ODEBRECHT, S.; OLIVEIRA, M.L. The distributions of O-acetyl-groups in partially acetylated xylan. An. Acad. Brasil. Ciênc., 51(3):429-433, 1979.
39. CORRÊA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Plantas Exóticas Cultivadas, 5, Rio de Janeiro, G.B., Ministério da Agricultura. Inst. Brasil. de Desenvol. Florestal:315, 1974.
40. COSTA, P.M.A.; VAZ DE MELO, H.; MAYORESE, V.B.; PACHECO, L.; PATO, J.M. Valor nutritivo do milho opaco-2 para suínos. Rev. Ceres, 18(95):1-22, 1971.
41. CRESCENZI, V.; DENTIN, M.; DEA, I.C.M. The influence of side-chains on the dilute solution properties of three structurally related, bacterial, anionic polysaccharides. Carbohydr. Res., 160:283-302, 1987.
42. DARVILL, A.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P.; DELMER, D.P. in: Biochemistry of Plants, vol. 1, TOLBERT, N.E. (Ed.) Academic Press, New York, 1980, p.91-162.
43. DAYRELL, M.S. Extração e Estudo do valor nutritivo de proteínas de folhas de "Ora-pro-nobis" (*Pereskia aculeata* Mill). Belo Horizonte, Tese de Mestrado, U.F.M.G., 1977.
44. DAYRELL, M.S.; VIEIRA, E.C. Leaf protein concentrate of the cactaceae *Pereskia aculeata* Mill, II: Nutritive Value. Nutrition Reports International, 15:539-545, 1977.

45. deBELDER, A.N.; NORRMAN, B. The distribution of substituents in partially acetylated dextran. Carbohydr. Res., 8:1-6, 1968.
46. DEES, J.C. Efeito da Adição de Proteína Isolada de Soja e de Folhas de "Ora-pro-nobis" (*Pereskia aculeata* Mill) sobre a qualidade de Macarrão de trigo. Viçosa, Tese de Mestrado, U.F.V., 1981.
47. DENT, C.E. A study of the behaviour of some sixty amino-acids and other ninhydrin-reacting substances on phenol-"collidine" filter-paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids. Biochem. J., 43:169-180, 1948.
48. DESCOLE, R.H. Cactaceae. Genera et Spēcies Plantarum Argentinarun, I, In: Aedibus Guillermo Kraft Ltda. Sociedade Anonima de Impresiones Generales:49-79, 1943.
49. DEVINCENZI, I.A.A. Aspectos sobre alguns componentes do caule de *Schizolobium parahybum* (Vell) Blake. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da U.F.Pr., 1985.
50. DISCHE, Z. Color reactions of hexosamines. Meth. Carbohydr., 1:507-512, 1962.
51. DUBOIS, M., GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28:350 - 356, 1956.



52. DUDMAN, W.F.; BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed polysaccharides on cellulose acetate. Can. J. Chem., 46:3079-3084, 1968.
53. EASTWOOD, M.A. et alii. Physical characteristics of fiber influencing the bowel. Cereal Food World, 22(1):10-11, 1977.
54. ELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S.; HOLME, T.; LINDBERG, A.A. Structural studies on the O-specific side-chains of the cell-wall lipopolysaccharides from *Salmonella typhimurium* 395 MS. Carbohydr. Res., 8:43-45, 1968.
55. FAO. El Estado Mundial de la Agricultura y la alimentación, 1983; Análisis Mundial, nº 16, Roma, 1984, p. 1-44.
56. FINCHER, G.B.; STONE, B.A.; CLARKE, A.E. Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. Ann. Rev. of Plant Physiol., vol.34:47-70, 1983
57. FONSECA, H.; ARZOLLA, J.D.P.; SARRUGE, J.R. Aminoácidos livres de três variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) do Paranā, 1ª Simpósio Brasileiro de Cromatografia. p.45-50, 1964.
58. GLICKSMAN, M.; SCHACHAT, R.E. Gum arabic. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J.N. Industrial Gums, New York, Academic Press Inc.:213-298, 1959.
59. GONÇALVES, M.L. Cactaceae. Flora de Moçambique, 82 Im

prensa Portuguesa, Lisboa, 1, 1979.

60. GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can. J. Chem., 53:1212-1223, 1975.
61. GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Structure-dependent, molecular-motion parameters of branched-chain polysaccharides. Carbohydr. Res., 72:C1-C5, 1979.
62. GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem., Biochem., 38:13-104, 1981.
63. GORIN, P.A.J.; GIBLIN, E.M.; SLATER, G.P.; HOGGE, L. Improved resolution of O-methylalditol acetates by gas-liquid chromatography on capillary columns with blended coatings of OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res., 106:233-238, 1982.
64. GOTTLIEB, M. Polysaccharides of *Crithidia fasciculata*: identification and partial characterization of a cell surface constituent. Biochem. Biophys. Acta, 541:444-458, 1978.
65. GRAVANIS, G.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. Comparative behavior of the bacterial polysaccharides xanthan and succinoglycan. Carbohydr. Res., 160:259-265, 1987.
66. GROB, K.; GROB, K. JR. Isothermal analysis on capilla

- ry columns without stream splitting. J. Chromatog., 94:53-64, 1974.
67. HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulphoxide. J. Biochem., 55:205-207, 1964.
68. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107:8-16, 1915.
69. HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. J. Biol. Chem., 180:249-261, 1949.
70. HIRST, E.L.; PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. Meth. Carbohydr. Chem., 5:287-296, 1965.
71. HOWARD, B.H. Hydrolysis of the soluble pentosans of wheat flour and *Rhodymenia palmata* by ruminal micro-organism. Biochem. J., 67-643, 1954.
72. HUANG, C.T.L. et alii. Fiber intestinal sterols and colon cancer. Am. J. Clin. Nutr., 31(3):516-526, 1978.
73. HUMMEL, C. Macaroni products. 2. ed. London, Food Trade Press Ltd., 1966, 287p.
74. IPARDES-FUNDAÇÃO Edison Vieira. Considerações sobre a situação nutricional da população de baixa renda de Curitiba, Curitiba, 1985, 67p.

75. JACOBS, M.B. Gums, cereals, starch, other polysaccharides, flour, and bread. In: JACOBS, M.B. The Chemical Analysis of Food and Food Products. 3<sup>a</sup> edição. New York, D. Van Nostrand Company, Inc.:476-508, 1958.
76. JANSSON, P.-E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chem. Commun., N<sup>o</sup>8, Univ. of Stockholm:1-72, 1976.
77. JANSSON, P.-E.; LINDBERG, B.; LINDQUIST, U.; CARLO, D. J. Structural studies on the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* Type 17A. Carbohydr. Res., 118:157-171, 1983.
78. JONES, J.K.N.; SMITH, F. Plant gums and mucilages. Adv. Carbohydr. Chem., 4:243-292, 1949.
79. JOSELEAU, J.-P. Structural investigation of the capsular polysaccharide of *Klebsiella serotype* K49. Carbohydr. Res., 142:85-92, 1985.
80. KABAT, E.A.; MAYER, M.M. Kjeldahl nitrogen determination. In: Experimental Immunochemistry. Thomas, C.C. (Ed.). Bannerstone house, Springfield. Illinois, 476-483, 1964.
81. KAKUTA, M.; MISAKI, A. Polysaccharide of "Junsai (*Bra*senia schreberi J.F.Gmel)" mucilage: constitution and linkage analysis. Agric. Biol. Chem., 43:993-1005, 1979.

82. KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K.W.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. Plant Physiol., 51:188-196, 1973.
83. KEENAN, M.H.J.; BELTON, P.S.; MATTHEW, J.A.; HOWSON, S. J. A  $^{13}\text{C}$ -n.m.r study of sugar-beet pectin. Carbohydr. Res., 138:168-170, 1985.
84. KISS, J.  $\beta$ -Eliminative degradation of carbohydrates containing uronic acid residues. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 29:229-303, 1974.
85. KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LÖW, I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glykosiden. Angew. Chem., 67(1):32, 1955.
86. LAU, J.M.; McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I. A pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. Carbohydr. Res., 137:111-125, 1985.
87. LAWSON, C.J.; McLEARY, C.W.; NAKADA, H.I.; REES, D.A. SUTHERLAND, I.W.; WILKINSON, J.F. Structural analysis of colanic acid from *Escherichia coli* by using methylation and base catalysed fragmentation. Biochem. J., 115:947-958, 1969.
88. LAMPORT, D.T.A.; MILLER, D.H. Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom. Plant Physiol., 48:454 - 456, 1971.

89. LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. In: GINSBURG, V. (Ed.). Meth. Enzym. XXVIII B, New York, Acad. Press, 178-195, 1972.
90. LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J.; NIMMICH, W. Structural studies of the *Klebsiella* O, group 9 lipopolysaccharide. Carbohydr. Res., 23:47-55, 1972.
91. LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J.; THOMPSON, J.L. Degradation of polysaccharides containing uronic acid residues. Carbohydr. Res., 28:351-357, 1973.
92. LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. Specific degradation of polysaccharides containing uronic acid residues. Meth. Carbohydr. Chem., 7:142-148, 1976.
93. LINDBERG, B.; LINDH, F.; LÖNNGREN, J. Modification of polysaccharides containing uronic acid residues. Carbohydr. Res., 61:81-87, 1978.
94. LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. Methylation analysis of complex carbohydrates: general procedure and application for sequence analysis. Meth. Enzym., 50. Part C:3-33, 1978.
95. LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J.; THOMPSON, J.L.; NIMMICH, W. M. Structural studies of the *Klebsiella* Type 9 capsular polysaccharide. Carbohydr. Res., 25:49-57, 1982.
96. MARON, S.H.; PRUTTON, C.F. Principles of Physical Chemistry, 4<sup>a</sup> edição, London, The Macmillan Company Collier-Macmillan Limited, 835-868, 1965.

97. McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell wall, X-Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. Plant Physiol., 66:1120-1134, 1980.
98. MENDELOFF, A.J. Dietary fiber and gastrointestinal diseases. Med. Clin. of N. Am., 62(1):165-172, 1978.
99. MIRANDA, P.M.; HORWITZ, D.L. High fiber diets in the treatment of *Diabetes mellitus*. Annals of Internal Medicine, 88:482-486, 1978.
100. MISRA, V.; MISRA, V.P. Studies on viscosity behavior of concentrated sodium and potassium halides in aqueous D-mannitol solution. Carbohydr. Res., 63:29-40, 1978.
101. MORT, A.J.; BAUER, W.D. Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*: changes with culture age and correlations with binding of soy bean seed lectin to the bacteria. Plant Physiol., 66:158-163, 1980.
102. MORT, A.J.; BAUER, W.D. Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. J. Biol. Chem., 257(4): 1870-1875, 1982.
103. MYSELS, K.J. Introduction To Colloid Chemistry, New York, Interscience Publishers, Inc., 475p, 1959.

104. O'NEILL, M.A.; SELVENDRAN, R.R. Glycoproteins from the cell wall of *Phaseolus coccineus*. Biochem. J., 187:53-63, 1980.
105. O'NEILL, M.A.; MORRIS, V.J.; SELVENDRAN, R.R.; SUTHERLAND, I.W.; TAYLOR, I.T. Structure of the extracellular gelling polysaccharide products by *Enterobacter* (NCIB 11870) species. Carbohydr. Res., 148:63 - 69, 1986.
106. PERLIN, A.S.; CASU, B. Spectroscopic methods. In: The polysaccharides, vol.1, ASPINALL, G.O. (Ed.). Academic Press, New York, 1983, p.133-193.
107. PETERSON, E.A. Cellulose ion exchangers. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. WORK, T.S.; WORK, E. (Eds.). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1970, p.262-264.
108. PILNIK, W.; ROMBOUITS, F.M. Polysaccharides and food processing. Carbohydr. Res., 142:93-106, 1985.
109. REES, D.A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. Adv. Carbohydr. Chem., 24:267-332, 1969.
110. REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GORIN, P.A.J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracatinga). A study of O-acetyl group migration. Carbohydr. Res., 135:129-140, 1984.
111. RICHARDSON, J.B.; DIXON, M. Varicane veins in tropi -



- cal Africa. The Lancet, 9(4):791-792, 1977.
112. ROY, N.; GLAUDEMANS, C.P.J. On the structure of mammalian lung galactan. Carbohydr. Res., 63:318-332, 1978.
113. SANFORD, P.A.; CONRAD, H.E. The structure of the *Aerobacter aerogenes*, A<sub>3</sub>(SI) polysaccharide. I - A reexamination using improved procedures for methylation analysis. Biochemistry, 5:1508-1517, 1966.
114. SANDFORD, P.A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: The Polysaccharides, vol.2, ASPINALL, G.O. (Ed.). Academic Press, New York, 1983, p. 411-489.
115. SCALA, J. Fiber - the forgotten nutrient. Food Technol., 28(1).34-35, 1974.
116. SCHULTZ, T. Determination of the degree of esterification of the ester methoxyl content of pectin by saponification and titration. Meth. Carbohydr. Chem., 5:189-191, 1965.
117. SCHUMANN, C. Cactaceae. In: de MARTII. Flora Brasiliensis, 5, Part II, New York, Wheldon & Wesley, Ltd. Stechert-Hafner Service Agency, Inc.:182-322, 1967.
118. SCOTT, J.E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues. Meth. Biochem. Anal., 8:145-197, 1960.
119. SCOTT, J. E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. In: Whistler, R.L. (Ed.).

- Meth. Carbohydr. Chem., 5, New York, Acad. Press., 38-44, 1965.
120. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96:282-292, 1979.
121. SHELLEMBERGER, J.A. Productions and utilization of wheat. Chemistry and technology, POMMERANZ, Y. (Ed.). St. Paul, 1971, p.1-17.
122. SIERAKOWSKI, M.R. et alii. Estudo do polissacarídeo extraído de folhas de *Pereskia aculeata* Mill. Arch. Biol. Tech., 24(1):58, 1981.
123. SIERAKOWSKI, M.R. Alguns aspectos químicos, físico-químicos e estruturais da mucilagem extraída de folhas de *Pereskia aculeata* Mill. Curitiba. Tese de Mestrado, U.F.Pr., 1982.
124. SIERAKOWSKI, M.-R.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C. Some structural features of a heteropolysaccharide from the leaves of the cactus *Pereskia aculeata*, Mill. Phytochemistry, 26(6):1709-1713, 1987.
125. SIERAKOWSKI, M.-R.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C. Location of O-acetyl groups in the heteropolysaccharides of the cactacea *Pereskia aculeata*. Carbohydr. Res. Submitted for publication.
126. SMITH, D.B.; COOK, W.H.; NEAL, J.L. Physical studies

- on carrageenin and carreegeenin fractions. Arch. Biochem. Biophys., 53:192-203, 1955.
127. SMITH, R.J. Determination of moisture and ash. Meth. Carbohydr. Chem., 4:36-42, 1964.
128. ~~S~~OMME, R. Degradation of glucuronic acid-containing xopolysaccharides from *Rhizobium* by the Hakamori methylation procedure. Carbohydr. Res., 152:237-241, 1986.
129. SOWDEN, J.C. The saccharinic acids. Adv. Carbohydr. Chem., 12:35-79, 1957.
130. SPILLER, G.A.; SHIPLEY, E.D. Perspectives in dietary fiber in human nutrition. World Review Nutrition Diet., 27:105-131, 1977.
131. STAUB, A.M. Removal of proteins. SEVAG Method. In: WHISTLER, R.L. (Ed.). Meth. Carbohydr. Chem., 5:5-6, 1965.
132. STEPHEN, A.M. Other plant polysaccharides. In: The polysaccharides, vol.2, ASPINALL, G.O. (Ed.). Academic Press, New York, 1983, p.97-195.
133. SWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. Anal. Chem., 37:1602-1604, 1965.
134. SWENSON, H.A. Intrinsic viscosity and its conversion

- to molecular weight. In: WHISTLER, R.L. (Ed.). Meth. Carbohydr. Chem., 3:85-91, 1963.
135. TALMADGE, K.W.; KEEGSTRA, K.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. Plant Physiol., 51:158-173, 1973.
136. TOMAN, R.; KARÁCSONYI, Š.; KUBAČKOVÁ, M. Studies on the pectin present in the bark of white willow (*Salix alba* L.): fractionation and acidic depolymerization of the water-soluble pectin. Carbohydr. Res., 43:111-116, 1975.
137. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents. Nature, 166:444-455, 1950.
138. TYLER, J.M. The seed mucilage of *Lepidium sativum* (Cress). Part II. Products of hydrolysis of the methylated mucilage and the methylated degraded mucilage. J. Chem. Soc.:5300-5310, 1965.
139. WHISTLER, R.L. Factors influencing gum cost and applications. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. Industrial Gums, New York, Acad. Press Inc.:1-13, 1959.
140. WINTON, A.L.; WINTON, K.B. The analysis of foods. John Wiley & Sons Inc., 1945, 1000p.

141. WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. Meth. Carbo-  
hydr. Chem., 2:211-215, 1963.
142. YEATS, J.A. "El proteccionismo agrícola contemporáneo:  
un análisis de sus efectos económicos internaciona -  
les y de las opciones de reforma institucional: In-  
tegración Latinoamericana, 68:34-53, 1982.