

RICARDO WAGNER

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO
POLISSACARÍDEO PRESENTE NA GOMA DE
Vochysia sp. (QUARUBA)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA

2003

TERMO DE APROVAÇÃO

RICARDO WAGNER

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO PRESENTE NA GOMA DE *Vochysia* sp. (QUARUBA)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



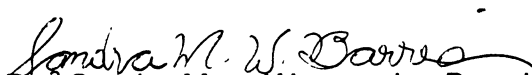
Prof. Dr. Philip Albert James Gorin (Orientador)
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.^a Dr.^a Juliana Maurer Menestrina
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.^a Dr.^a Sandra Mara Woranovicz-Barreira
Depto. Farmácia - UFPR

Curitiba, 26 de fevereiro de 2003

Orientação: Prof. Dr. Philip Albert James Gorin

Co-orientação: Prof. Dr. Marcello Iacomini

“O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é. Se insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tenha no começo.”

MAHATMA GANDHI

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Philip Albert James Gorin, que ao primeiro encontro demonstrou interesse pela orientação deste trabalho e sempre se mostrou pronto a resolver qualquer dúvida que eu pudesse ter. Por eu o considerar um modelo de pesquisador e tentar seguir seus passos, mesmo quando o seu português não ajudasse muito, ele sempre me deu liberdade de atuação e seguir minha própria linha de pensamento, e somente quando eu não enxergava uma saída é que ele me dava a luz que eu precisava.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, que foi a pessoa que me direcionou para esta linha de pesquisa, pois soube como ninguém “vender o seu peixe” na visita ao seu laboratório, mesmo porque minha sala fica ao lado da sua.

Ao colegiado do curso de Pós-Graduação que foi de extrema importância para meu aprendizado e sempre somou (ou multiplicou) o conhecimento repassado nos créditos cursados.

Às coordenadoras do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Prof^a Dr^a Fany Reicher e Prof^a Dr^a Leda Satie Chubatsu, pelo empenho e dedicação prestados a todos os alunos e ao crescimento e reconhecimento deste curso.

A Dona Marilza pelo seu bom humor tradicional e por agora lembrar o meu nome.

Aos amigos do Laboratório 247, Anderson, Caroline (Carolzinha), Juliana (Juju) e Lucimara (Lucci) com os quais coabitei durante um bom período e que me deram todo o apoio quando iniciei esta jornada, me dando dicas valiosas sobre todas as técnicas utilizadas rotineiramente em nosso trabalho.

Aos amigos do Laboratório E-1, Ana Helena (Ana Tereza Izaura), Rodrigo Vassoler (Vassola), Lauro (Lauritius), Giovana (Miss Alquini), Guilherme (Gui), Rafaela (Rafinha) e ao desertor Fábio, que me proporcionaram ótimos momentos em suas companhias, quer seja tomando um café da cafeteira “nova” ou mesmo ouvindo as discussões científicas sobre o estado de hidratação do peixe (será que ele sente sede??). Ao Cesar pelas inúmeras análises de RMN e pelo vocabulário sempre inovador!!!

Aos meus amigos do Laboratório E-3, Alan Sérgio, Rosiane, Paula e Adriano que mesmo em outra linha de pesquisa sempre nos trouxeram uma dose de alegria para as sextas-feiras.

Aos meus companheiros de Laboratório, Fernanda (Ferf's) e Rodrigo (Rareis) e Andrea que me acolheram na antiga sala como alguém sempre quis ser recebido. Ferf's será que posso abrir um frasco de metanol aqui??? Reis, ela nem está olhando, pode abrir!!! Ah, eu estou sim, vá lá na capela!!!

Aos meus amigos de turma:

Ana Cláudia (Florzinha) – obrigado pelo seu companherismo, sinceridade e atitude diante dos fatos. Quando precisar montar outro guarda-roupas me chame!!!

André Luis (The Flash) – espero algum dia apresentar referatas como você, só que falando mais devagar e respirando, é claro!!!

André Mariano (Garotinho Saúde) – quisera eu ter o fôlego para tantas corridas, natação e pedaladas!!!

Daniella (Amiga) – ainda quero abrir o restaurante, pode ser em Maringá, ou quem sabe em Nova York (gente chic é outra coisa!!!)

Elaine (Despreparo) – sua amizade é algo que eu soube como conquistar e quero mantê-la comigo para sempre. Obrigado pelo apoio incondicional no início do trabalho!!!

Juliana (Miss Homeopatia) – nossa amizade é anterior ao sonho de fazer mestrado e perdurará além, mas pare de tomar “águinha” e comer bolinha de açúcar!!!

Karen (A Anfitriã) – simplesmente não há outra maneira de dizer muito obrigado por tudo o que você fez e continua fazendo por todos. A pessoa mais terna que já conheci. Quando vamos na Suzi???

Luiza (Docinho) – quer uma barra de chocolate e um livro? Ou quem sabe um pote de sorvete? Um dia vou ser igual a você!!!

Marco André (Sossego) – calma e paciência são duas virtudes encontradas em você, apesar do pavio curto!!!

Mariana (Florzinha) – essa menina vai longe... e a outra que está por vir???

Priscila (Mitochondrial Girl) – quantos ratinhos hein??? Amiga para todas as horas, até o sol nascer com a saideira!!!

Thales (Garoto enxaqueca) – menino não se stresse tanto, tenha calma que você consegue!!!

A todos vocês muito obrigado pela amizade e companheirismo, e não pensem que esqueci dos agregados Marcus, Emerson, Luis, Patricia, Fernandinha, Adriana e Raphael.

Um agradecimento especial a Sandra pelo seu sorriso sempre fraternal e amizade. E a todos que por ventura eu esqueci de citar, mas que com certeza, fazem parte de minha vida. A Selma e a Juliana pelos abraços e amizade.

Finalmente, aos meus pais pela dedicação a mim dispensada, confiança e amor sem os quais eu não poderia estar onde estou hoje. As minhas irmãs, Márcia e Stela, pelo convívio e amor demonstrados em pequenos gestos. Ao meu amigo-irmão, quase Doutor, Cloves pelo incentivo e generosidade, e acima de tudo amizade. E ainda Osvaldo, Luciane, Tetê e Vitória (uma extensão da nossa família) e Beatriz (Bia) minha eterna amiga!!!

A CAPES e PRONEX-Carboidratos, pelo suporte financeiro deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 UMA VISÃO GERAL SOBRE A IMPORTÂNCIA DOS CARBOIDRATOS	2
1.2 DAS GOMAS E AFINS	4
1.3 SOBRE A PLANTA <i>Vochysia</i> sp. (QUARUBA)	6
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 OBTENÇÃO DO EXSUDATO.....	12
3.2 MATERIAL DE ESTUDO	12
3.3 EXTRAÇÃO	12
3.3.1 Extração aquosa a frio.....	12
3.4 ESQUEMA GERAL DAS EXTRAÇÕES	13
3.5 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	14
3.5.1 Separação dos polissacarídeos do precipitado etanólico por congelamento e degelo.....	14
3.6 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA.....	14
3.6.1 Hidrólise ácida total.....	14
3.6.2 Redução e acetilação.....	15
3.6.3 Dosagem de ácido urônico.....	15
3.7 ANÁLISES DE METILAÇÃO	16
3.7.1 Metilação.....	16
3.7.2 Metanólise.....	17
3.7.3 Hidrólise total do polissacarídeo per-O-metilado.....	17
3.8 REDUÇÃO DOS GRUPOS CARBOXILAS DO POLISSACARÍDEO	17
3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS	18

3.9.1 Métodos analíticos gerais.....	18
3.9.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS).....	19
3.9.3 Análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (¹³ C–RMN).....	19
3.9.4 Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência com detector de espalhamento de luz de multiângulos (HPSEC-MALLS).....	20
3.10 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS CONTENDO ÁCIDO URÔNICO POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL.....	20
3.11 CROMATOGRAFIA EM PAPEL.....	21
3.11.1 Cromatografia em papel analítica.....	21
3.11.2 Cromatografia preparativa em papel.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 POLISSACARÍDEO ORIGINAL.....	24
4.2 POLISSACARÍDEO CARBOXIRREDUZIDO	27
4.3 ANÁLISE DOS DADOS DE METILAÇÃO	28
4.4 ANÁLISE DE RMN.....	29
4.5 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS CONTENDO ÁCIDO URÔNICO	32
4.4.1 Análise do oligossacarídeo Oligo-1.....	32
4.4.2 Análise do oligossacarídeo Oligo-2	35
5 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE SIGLAS, FÓRMULAS E ABREVIATURAS

δ (delta):	deslocamento químico
$(\text{CH}_2\text{O})_n$:	fórmula geral para carboidratos
C-n:	carbono-n (ex. C-1, carbono-1)
^{13}C :	carbono-13
^{13}C -RMN:	ressonância magnética nuclear de carbono-13
^1H :	próton
^1H -RMN:	ressonância magnética nuclear de próton
Ara:	arabinose
cm:	centímetros
COSY:	correlated spectroscopy (espectroscopia de correlação)
-D-:	pertence à série D
D_2O :	água deuterada
ESI-MS:	“electron-spray impact – mass spectrometry” (elétron-spray – espectrometria de massa)
Gal:	galactose
GC-MS:	“Gas chromatography – mass spectrometry” (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa)
Glc:	glucose
GlcA:	ácido glucurônico
h:	horas
HCl:	ácido clorídrico
HMQC:	heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy
HPSEC-MALLS:	“High Performance Size Exclusion Chromatography – Multi-Angle Laser Light Scattering” (Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência - espalhamento de luz de multiângulos)
M:	molar
m/z :	relação entre massa molecular e carga
Man:	manose

Me:	metil
Me ₂ SO:	dimetilsulfóxido
MES:	2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid
mg:	miligrama
MHz:	mega hertz
min.:	minutos
ml:	mililitros
mM:	milimolar
NaBH ₄ :	boroidreto de sódio
NaBD ₄ :	boroidreto de sódio deuterado
NaN ₃	azida sódica
NaNO ₂	nitrito de sódio
NaOD:	soda deuterada
NaOH:	hidróxido de sódio
NaOMe:	metóxido de sódio
nm:	nanômetros
Oligo-1:	oligossacarídeo 1
Oligo-2:	oligossacarídeo 2
<i>p</i> :	forma piranosídica
p.:	página
P.A.:	grau de pureza para análise
pH:	potencial hidrogeniônico
Poli86:	polissacarídeo original
ppm:	parte por milhão
R:	rendimento
R _{Lact} :	relação entre a distância percorrida pelo desconhecido e a distância percorrida pela lactose
ROESY:	rotating-frame nuclear Overhauser spectroscopy
rpm:	rotações por minuto
TFA:	ácido trifluoroacético
TOCSY:	total correlated spectroscopy

TRIS/HCl: tampão Tris (aminometilidenotrimetanol) levado a determinado pH com HCl

v/v: volume por volume

vol.: volumes

LISTA DE FIGURAS

1	Árvore de <i>Vochysia</i> sp.....	8
2	Espectro de HPSEC-MALLS do polissacarídeo Poli86	27
3	Espectro de ¹³ C-RMN do polissacarídeo original	33
4	Espectro de ¹³ C-RMN do polissacarídeo carboxirreduzido	34
5	Espectro de ¹³ C-RMN do oligossacarídeo Oligo-1.....	36
6	Espectro de ¹³ C-RMN (HMQC) do oligossacarídeo Oligo-1	37
7	Espectro de ¹³ C-RMN (COSY) do oligossacarídeo Oligo-1	38
8	Espectro de ¹³ C-RMN do oligossacarídeo Oligo-2.....	40
9	Espectro de ¹³ C-RMN (COSY) do oligossacarídeo Oligo-2.....	41
10	Espectro de ¹³ C-RMN (HMQC) do oligossacarídeo Oligo-2	42
11	Espectro de ¹³ C-RMN (TOCSY) do oligossacarídeo Oligo-2.....	43
12	Espectro de ¹³ C-RMN (ROESY) do oligossacarídeo Oligo-2.....	44
13	Espectro de electron-spray do oligossacarídeo Oligo-2	46
14	Esquema de fragmentação do Oligo-2	47

LISTA DE TABELAS

1	Alditóis acetatos do polissacarídeo original	28
2	Alditóis acetatos do polissacarídeo original com dosagem de ácido urônico	29
3	Alditóis acetatos comparativo dos polissacarídeos original e carboxirreduzido.....	30
4	Alditóis acetatos parcialmente metilados do polissacarídeo original e carboxirreduzido.....	31
5	Assinalamentos do Oligo-1	37
6	Assinalamentos do Oligo-2	41

LISTA DE FLUXOGRAMA

1	Esquema de extração do polissacarídeo da Quaruba.....	13
---	---	----

RESUMO

A goma de exsudato de *Vochysia* sp., Vochysiaceae, foi coletado na Floresta Amazônica, município de Caquetá – AC. Esta goma foi solubilizada em água formando uma solução de baixa viscosidade. O polissacarídeo obtido foi analisado por HPSEC-MALLS e mostrou-se como uma molécula heterogênea. Tentativas de purificação por congelamento e degelo e precipitação por Cetavlon mostraram-se ineficazes, sugerindo a presença de um agregado molecular, o qual não foi desfeito pelo tratamento com uréia. A hidrólise ácida forneceu a seguinte composição monossacarídica Man:GlcA:Ara:Gal:Glc na razão molar de 30:30:16:10:14. A presença do ácido glucurônico foi determinada através de carboxirredução. As análises de metilação nos dois polissacarídeos, original e carboxirreduzido, revelaram unidades de manose substituídas em O-2 e unidades de glucose, demonstradas no polissacarídeo carboxirreduzido, substituídas em O-4. Estes dois derivados estão em maior porcentagem e pode-se inferir a presença de uma cadeia principal formada por unidades de manose e ácido glucurônico. Os espectros de ^{13}C -RMN revelaram um espectro muito simples com apenas dois sinais na região de carbono anomérico, sugerindo uma estrutura de grupos dissacarídicos regularmente distribuídos. Os sinais em δ 99,3 e δ 101,5 podem ser atribuídos ao C-1 das unidades de manose e ácido glucurônico. O sinal em δ 174,8 corresponde ao C-6 das unidades de ácido glucurônico. O espectro do polissacarídeo carboxirreduzido foi praticamente idêntico e onde foi observado o desaparecimento do pico de C-6 de ácido glucurônico, demonstrando que a carboxirredução foi eficiente. Resultado também confirmado pela dosagem zero de ácidos urônicos. O polissacarídeo original foi submetido a uma hidrólise ácida parcial para a produção de oligossacarídeos contendo ácido urônico. Estes foram separados e isolados por cromatografia preparativa em papel, dando um rendimento de 14% e 10,3% para o Oligo-1 e Oligo-2, respectivamente. Por análises de metilação foi encontrado para o Oligo-1, a presença do derivado 2,3,6-Me₃-Man. Entretanto este oligossacarídeo foi analisado

por ^{13}C - e ^1H -RMN, HMQC e COSY, sendo definido que trata-se de um dissacarídeo com a unidade de manose redutora, substituída em C-2 por uma unidade de ácido glucurônico no terminal não redutor na estrutura $\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$. O Oligo-2 apresentou por análises de metilação o derivado 2,3,6- $\text{Me}_3\text{-Man}$. Foram realizadas análises de ^{13}C - e ^1H -RMN, HMQC, COSY, TOCSY e ROESY, demonstrando que se trata de um tetrassacarídeo com dois grupos dissacarídicos idênticos ao anterior, $\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$, o que sugere esta unidade repetitiva para a cadeia principal. A estrutura deste oligossacarídeo foi confirmada por análise de electron-spray, que definiu não só a presença de quatro unidades monossacarídicas, como a seqüência destas unidades.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 UMA VISÃO GERAL SOBRE A IMPORTÂNCIA DOS CARBOIDRATOS

Do ponto de vista químico, a vida pode ser considerada como sendo um complexo sistema de reações que ocorrem dentro de seres vivos, desde o mais simples até o mais evoluído, o homem. O estudo destas reações e suas implicações dentro destes seres é o objetivo básico da Bioquímica como ciência.

Dentre os 4 temas principais para a Bioquímica, carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, os carboidratos representam uma parcela substancial para o entendimento global do funcionamento dos organismos, pois deles advêm, em primeiro estágio, a energia utilizada em vários outros processos. Podemos ter uma visão mais global, e dizer que os carboidratos são os constituintes orgânicos mais encontrados em nosso planeta. Tomando-se escalas sub-celulares e indo até escalas maiores, pode-se afirmar que em todas elas estão presentes os carboidratos, quer seja na forma monomérica, ou polimérica.

O termo carboidrato recebe esta denominação de sua fórmula mínima $(CH_2O)_n$, hidrato de carbono, que representa um átomo de carbono sendo hidratado por uma molécula de água; existe, entretanto, moléculas que seguem esta mesma fórmula, mas não são consideradas carboidratos, como o gliceraldeído (RUSSEL, 1981). Outros termos utilizados são: glicídeos e sacarídeos. O primeiro é derivado do grego "*glýcis*" e o segundo do latim "*saccharum*" que podem ser traduzidos como "*doce*" para o nosso idioma (STRYER, 1996).

Tendo como referencial que o começo da vida para a raça humana começa com a união entre um espermatozóide e um óvulo, e que para ocorrer este evento é necessário que o espermatozóide se ligue a um oligossacarídeo presente na superfície celular do óvulo (STRYER, 1996), verifica-se que tudo começa com os carboidratos e depois assume uma dimensão e complexidade da qual desvendamos apenas uma pequena parte.

A revista Science, no mês de março de 2001, publicou uma edição especial ao tema, e podemos notar o quão importante é o estudo e o conhecimento desenvolvido, até os dias de hoje, sobre a presença destes compostos. Nesta edição, o artigo publicado por RUDD *et al.* (2001), descreve como a glicosilação de

várias moléculas do sistema imune influencia em sua atuação. Embora a maioria dos antígenos de histocompatibilidade serem apresentados pelos complexos de histocompatibilidade maior (MHC), alguns antígenos glicopeptídicos de glicoproteínas requerem uma remoção enzimática de uma ou mais unidades sacarídicas para a sua clivagem.

Em vírus, como descrevem os autores, a glicosilação apresenta um papel importantíssimo como uma das estratégias para não serem reconhecidos pelo sistema imune. Esta glicosilação, que pode ser em apenas um resíduo de aminoácido, modifica o dobramento de proteínas de superfície, modificando os epítomos que são reconhecidos pelas imunoglobulinas.

Discutindo mais sobre o tema, eles dizem que os açúcares também são chaves importantes no reconhecimento célula-célula, onde ocorre o que pode ser chamado de sinapse imunológica (DELL e MORRIS, 2001). Ali, os oligossacarídeos presentes nos domínios proximais parecem restringir a orientação das moléculas de adesão celular, pois o tamanho e a localização destes açúcares fazem uma prevenção de uma interação proteína-proteína inespecífica. Neste artigo fica evidente como os carboidratos são importantes para a síntese, estabilidade, reconhecimento e regulação destas moléculas.

Hoje estuda-se não só a composição química desta classe de compostos, mas sua estereoquímica também. É bem estabelecido como a conformação espacial adquirida por estes compostos influencia em sua atuação. Casos clássicos são as moléculas de celulose, amido e glicogênio, onde o tipo de ligação envolvida muda completamente a propriedade destes compostos. No caso da celulose, onde as unidades β -D-glucosil estão unidas por ligações (1 \rightarrow 4), favorece que esta molécula apresente uma certa rigidez, ou uma natureza fibrosa, e faz com que seres humanos não se alimentem deste polímero pelo fato de não possuímos uma enzima, a celulase, capaz de degradá-lo. Já o amido e o glicogênio são polímeros de D-glucose unidas por ligações (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6). Então, o glicogênio e a amilopectina são moléculas semelhantes, em composição global, que variam no tamanho, na conformação e em qual organismo são encontradas, humanos e plantas respectivamente.

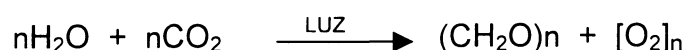
Tendo visto que a presença de carboidratos é essencial, não só para a vida humana na terra, é de vital importância que continuemos estudando, revisando

conceitos e sempre descobrindo, onde antes não se imaginava existir a presença destes compostos, novos rumos para a pesquisa, pois uma das maiores mudanças deixadas pelas pesquisas de carboidratos é o desenvolvimento de métodos para seqüenciar unidades monossacarídicas em polissacarídeos, já resolvidas para ácidos nucleicos e proteínas. Em um mundo que quer sempre descobrir o por quê das coisas, e cada vez mais voltado para o nível molecular, não podemos esquecer que no DNA, que encerra todas nossas informações, desde a mais simples proteína até o mais complexo processamento bioquímico, temos a presença de um açúcar para ancorar os aminoácidos responsáveis por estas informações.

1.2 DAS GOMAS E AFINS

O Carbono, elemento químico não-metálico do Grupo 4A da Tabela Periódica, símbolo C, número atômico 6, massa atômica 12,0107 e com nome derivado do latim “*carbo*”, que significa “*carvão*”, é o principal constituinte de várias moléculas vitais para a vida na terra (RUSSEL, 1981). Mesmo se apresentando em diferentes formas alotrópicas, ou combinado, o carbono representa o constituinte químico central de um grande número das moléculas conhecidas.

Um exemplo bem comum da sua forma combinada é o gás carbônico, CO₂, que compõe cerca de 0,03% do ar atmosférico. É com ele que as plantas, pelo fenômeno da fotossíntese, sintetizam as moléculas que servem como combustível e reserva para ela, segundo a reação descrita abaixo (STRYER, 1996):



Por meio da absorção de luz pela molécula de clorofila que são gerados, como produtos finais, o oxigênio e os carboidratos.

Os carboidratos gerados pela fotossíntese podem ser armazenados na forma de amido ou sacarose, sendo o primeiro sintetizado e armazenado em cloroplastos, e o segundo sintetizado no citosol e pode ser encontrado em alguns vegetais como a beterraba e a cana-de-açúcar (STRYER, 1996).

Devido a este grande teor de açúcar, algumas plantas podem ser atacadas por insetos, ou parasitas, em busca de alimento. Algumas destas plantas podem se defender através da produção de um exsudato gomoso, que pode conter, além de polissacarídeo, compostos fenólicos, enzimas e proteínas. Este exsudato foi definido, por F. SMITH e J. K. N. JONES (1949), como:

“Substâncias originárias de plantas que são obtidas como exsudações dos frutos, troncos ou galhos das árvores, espontaneamente, ou depois de injúria mecânica da planta, podendo ocorrer por incisão da casca, ou pela remoção de um galho, ou depois ainda de invasão por fungo ou bactéria.”

Estas gomas de exsudatos são constituídas principalmente por polissacarídeos gomosos produzidos, principalmente, por um grande número de plantas e que são facilmente vistos nos troncos das árvores, como massas de cor variável e às vezes seca. Elas não são produzidas exclusivamente nos troncos, mas também nos galhos e frutos e aparecem, na maioria dos casos, como mecanismo de defesa da planta. BELESKI-CARNEIRO *et al.* (1999) estudando a goma dos frutos de *Chorisia speciosa*, relata que esta goma era produzida após a injúria mecânica os frutos e que esta é muito similar a goma arábica.

A maioria das gomas estudadas até hoje são de Angiospermas, mas também são descritos estudos para Gimnospermas. As principais famílias que tiveram seus exsudatos pesquisados são: Anacardiaceae, Bromeliaceae, Burseraceae, Cactaceae, Combretaceae, Coniferaceae, Gnetaceae, Leguminoseae, Meliceae, Ombeliferae, Proteaceae, Rosaceae, Rutaceae, Sapotaceae e Sterculeaceae. Dentre estas a mais estudada é a família Leguminoseae, onde se encontra a Goma Arábica e muitas outras Acácias (MENESTRINA, 1999).

A composição dos exsudatos é muito variada de espécie para espécie, alguns são de composição muito complexa e isto torna o seu estudo cada vez mais interessante. STODDART e JONES (1968) trabalhando com a goma do limão (*Citrus limonia*) detectaram a presença de uma galactana altamente ramificada com ligações β -(1→3) e β -(1→6) dispostas de maneira não ordenada, com ramificações

de ramnose, ácido glucurônico e arabinose. DELGOBO *et al.* (1998) pesquisou a Goma nativa de Angico Branco (*Anadenanthera colubrina*) e descreve o polissacarídeo como uma estrutura extremamente complexa que contém 26 sinais na região de H-1 por ^1H -RMN e 20 sinais na região de C-1 por ^{13}C -RMN, o polissacarídeo em questão trata-se de uma arabinogalactana, onde a cadeia principal é composta de unidades de (1 \rightarrow 3)- β -galactopirranose e variados tipos de cadeias laterais.

Com a mesma complexidade se apresenta a Goma nativa do cajueiro, *Anacardium occidentale*, (MENESTRINA *et al.*, 1998). Uma heterogalactana ácida que apresenta como cadeia principal unidades de galactose unidas por ligações α -(1 \rightarrow 3).

LEÓN DE PINTO *et al.* (1997) isolou um polissacarídeo do exsudato de *Laguncularia racemosa* e por ser também um polissacarídeo muito complexo resolveu estudar os produtos obtidos da goma degradada pelo método controlado de Smith e chegou a um pentassacarídeo. Este mesmo pentassacarídeo foi obtido por hidrólise ácida parcial e o autor descreve este como sendo parte da cadeia principal, corroborando com os resultados obtidos de estruturas complexas de gomas, como foi afirmado por ASPINALL (1969).

1.3 SOBRE A PLANTA *Vochysia* sp. (QUARUBA)

As plantas da família Vochysiaceae geralmente são árvores grandes e as cascas dos galhos são, freqüentemente, esfoliadas. Inconfundíveis nas flores, zigomorfas, com uma ou duas anteras férteis, ou nos frutos, uma cápsula tripartida com sementes aladas ou indeicentes e com muitas partes características. As folhas, sempre opostas e completas, usualmente com numerosos veios secundários e uma veia marginal subcoletora. Muito fácil de reconhecer, quando estéril, pelas glândulas conspícuas formadas pelas bases das estípulas caducas em cada lado da base do pecíolo, isto sempre ocorre em *Qualea*, usualmente em *Erisma*, mas não em *Vochysia*. O gênero *Vochysia* freqüentemente tem folhas opostas em espiral, enquanto que os outros gêneros têm folhas opostas uniformemente (GENTRY, 1993).

As flores tem pétalas estreitas, amarelas e inflorescências racemiformes. São árvores que podem atingir até 20 metros de altura, dotadas de copa arredondada, o tronco pode ser cilíndrico. A florada ocorre, geralmente dos meses de junho até setembro por ser uma árvore de crescimento rápido é muito utilizada para reflorestamentos (LORENZI, 1998).

Nas matas mais úmidas predominam as *Vochysia*, embora tenham também espécies de *Qualea* e *Callisthene*. Ocorrem muitas espécies diferentes na "mata atlântica", de norte a sul, e na "mata amazônica". Geralmente as espécies silvestres de *Vochysia* geram árvores frondosas e com copas densas, cobrindo-se de cachos ou panículas amarelas por ocasião das floradas. Das espécies de cerrado, merece menção a *Vochysia thyrsoidea*, conhecida popularmente como "gomeira" ou "gomeira-de-lagoa-santa" encontra-se de São Paulo e Minas Gerais até Goiás e Tocantins. Esta espécie fornece uma goma semelhante à Goma Arábica, através de exsudação (escorrimento de "seiva" endurecida pelo tronco, provocada artificialmente através de ferimentos do tronco ou naturalmente). Essa "seiva" é também denominada de goma-arábica-de-Lagoa Santa, uma região do estado de Minas. Uma de suas belas espécies, *Vochysia magnifica*, é comum por aqui, encontrando-se florida entre abril e maio. É agora facilmente avistada nos capoeirões ou remanescentes isoladas, por toda região de Cotia, Caucaia - SP e arredores. Esta árvore silvestre tem médio à grande porte, podendo atingir, em locais propícios, até 20-30 m de altura, com troncos de diâmetro às vezes superiores à 60 cm. Sua madeira não é muito apreciada devido a sua relativa baixa densidade e pouca resistência à intempéries e insetos xilófagos (cupins, por exemplo). Ainda assim pode ser utilizada para obras internas, caixotaria e artesanatos de madeira. Sua florada coincide com a das paineiras, magnificamente floridas neste ano, tendo também sementes dispersadas pelo vento pouco antes da estação chuvosa, embora não perdendo totalmente as folhas no inverno (<http://www.cotianet.com.br/jornalatuante/mat072.htm>).

HESS *et al.* (1995) estudou a atividade antibacteriana de extratos da casca do tronco de *Vochysia divergens* contra *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexineri* e *Streptococcus* sp. e conclui que esta atividade antibacteriana é decorrente da presença de ácido serfíco, que está em maior concentração em todos os extratos

estudados. Isto pode explicar e justificar o uso popular da casca do tronco desta planta contra doenças infecciosas.



Figura 1: Visão da árvore e de um galho com inflorescências de uma espécie do gênero *Vochysia*. Retirado de: LORENZI, 1998.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Após levantamento bibliográfico, verificou-se que a goma da Quaruba ainda não havia sido estudada quanto à composição de carboidratos. A partir deste dado foram propostos os seguintes objetivos para o presente trabalho:

2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, purificar e caracterizar o(s) carboidrato(s) presente(s) na goma de exsudato da planta Quaruba (*Vochysia* sp.)

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e quantificar a fração solúvel em água à temperatura ambiente;
- Purificar, quantificar e analisar a composição do(s) polissacarídeo(s);
- Caracterizar a(s) estrutura(s) química(s) por meio de dados de metilação, degradações controladas de Smith e RMN mono e bidimensional;
- Determinar a estrutura de oligossacarídeos produzidos por hidrólise ácida parcial, através dos dados de metilação, RMN mono e bidimensional, e ESI-MS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

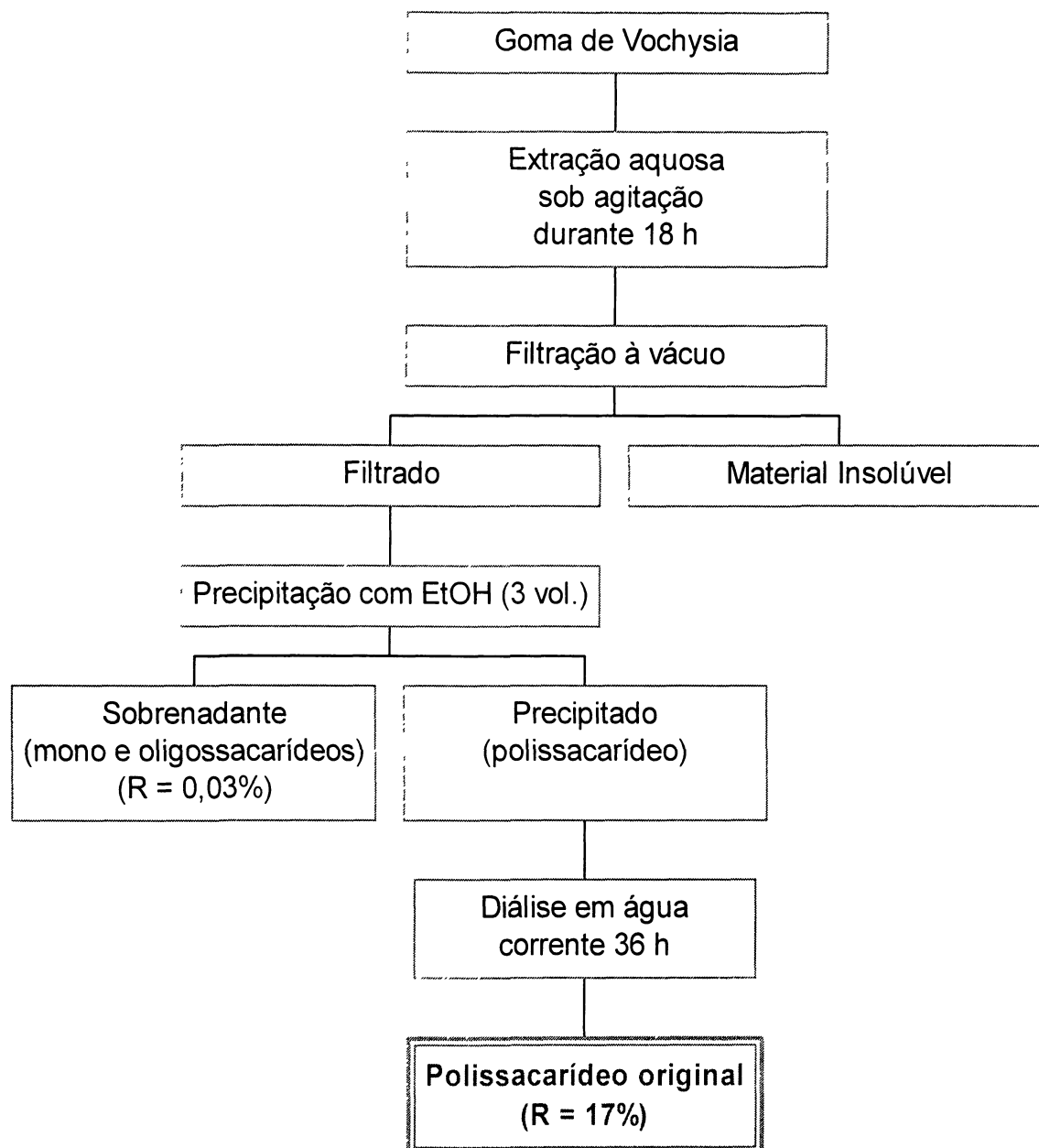
3.1 OBTENÇÃO DO EXSUDATO

A goma foi obtida por intermédio da EMBRAPA do Acre, na localidade de Porto Acre – AC, e trazida para estudo pela Dr^a Cirene L. Delgobo. Esta goma de exsudato foi extraída do tronco da planta *Vochysia* sp. (Vochysiaceae). Esta exsudação é de ocorrência natural, sem que tenha tido injúria mecânica na planta.

3.2 EXTRAÇÃO AQUOSA A FRIO

A goma bruta foi analisada visualmente para a existência de contaminantes e em seguida foi pesada, totalizando 37 g. Sob agitação mecânica constante, esta quantidade foi solubilizada em 300 ml de água destilada, à temperatura ambiente, durante 18 h. Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro Whatman. O material insolúvel foi reservado e o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida. A mistura foi precipitada com 3 volumes de etanol 96% e resfriado para facilitar a precipitação do polissacarídeo. Esta solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 min em centrífuga Beckman. O precipitado foi dialisado contra água corrente por 24 a 36 h e o sobrenadante etanólico foi concentrado até *secura* sob pressão reduzida, ressuspenso em pequeno volume de água e liofilizado.

Após a diálise o precipitado foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida até um volume menor e liofilizado. Esta extração rendeu uma fração (17%) denominada de “Polissacarídeo original”. No fluxograma 1 está demonstrado o esquema de extração do polissacarídeo.

FLUXOGRAMA 1: Esquema de extração do polissacarídeo da Quaruba

3.3 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

3.3.1 Fracionamento dos polissacarídeos do precipitado etanólico por congelamento e degelo

A fração obtida por extração aquosa sofreu o processo de purificação por congelamento e degelo, segundo GORIN e IACOMINI (1984).

A fração foi solubilizada em água destilada e submetida ao processo de congelamento e posterior degelo à temperatura ambiente, resultando em um material que foi solúvel em água, com uma pequena formação de precipitado, insolúvel em água fria. Após cada descongelamento a amostra foi centrifugada (10.000 rpm, 20 min), sendo o sobrenadante e o precipitado separados após este procedimento. Este processo de purificação foi repetido diversas vezes até que não se observasse mais nenhuma partícula na solução, ou seja, dosagem de açúcar total negativo (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.3.2 Fracionamento dos polissacarídeos do precipitado etanólico por precipitação com Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônio)

O polissacarídeo obtido do precipitado etanólico foi submetido ao processo de purificação por precipitação com Cetavlon, um sal quaternário de amônio, em diferentes pH, como descrito por SCOTT (1965) e DUARTE e JONES (1971).

Uma fração de 300 mg foi dissolvida em 50 ml de água, a qual foi adicionado igual volume de solução de Cetavlon 3%, pH 7. Após agitação mecânica por 30 min, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm durante 20 min. Houve formação de precipitado imediatamente. Este material foi descomplexado com solução de NaCl 4M e à solução foi adicionado excesso de etanol. Este material foi centrifugado novamente e o sobrenadante foi separado do precipitado. Este procedimento foi

repetido mais três vezes. Em seguida o precipitado foi redissolvido em água e dialisado durante 48 h, sendo posteriormente congelado e liofilizado.

Ao sobrenadante desta porção foi adicionado tampão borato, pH 8,5. Houve uma pequena formação de precipitado que rapidamente solubilizou. Esta solução foi centrifugada e não foi verificada a formação de precipitado. Então, a solução foi elevada a pH 10 com adição de NaOH M, com auxílio de potenciômetro, e agitada durante 30 min, novamente não foi verificada a formação de precipitado, não foi dado prosseguimento ao aumento de pH até 12, pois quase todo o polissacarídeo foi recuperado na precipitação em pH 7.

A fração precipitada em pH 7,0 foi pesada (240 mg) e após hidrólise e derivatização, analisada por GC-MS. (item 3.8.2, p. 22)

3.4 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS CONTENDO ÁCIDO URÔNICO POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL

Um teste preliminar foi realizado utilizando-se uma fração de 5 mg de material. Este material foi hidrolisado com TFA M, a 100°C durante 3 h. O resultado foi analisado por cromatografia em papel Whatman nº1 com o sistema de fase móvel 1:1:1 (*n*-butanol:piridina:água). Este cromatograma apresentou duas regiões onde poderiam ser encontrados oligossacarídeos. Baseado neste teste preliminar, partiu-se de 1,0 g de goma e fez-se a hidrólise seguindo-se o mesmo protocolo para a produção de oligossacarídeos contendo ácido urônico. Decorrido o tempo de hidrólise, a solução foi transferida para um balão de fundo redondo e levada a secura em rotaevaporador sob pressão reduzida. Este material foi novamente ressuspenso em água destilada e, mais uma vez, levado à secura, para garantir que todo o ácido fosse evaporado.

O material seco foi retirado do balão, ressuspenso em água destilada e aplicado em papel Whatman nº 3 para realizar-se as cromatografias preparativas em papel que foram corridas com a fase móvel 1:1:1 (*n*-butanol:piridina:água), e destas cromatografias preparativas foram isolados dois oligossacarídeos com tempos de

retenção em relação a lactose (R_{Lact}) de 0,72 para o “Oligo-1” e de 0,27 para o “Oligo-2”. A distância percorrida pela lactose foi de 11 cm.

Depois de realizadas todas as cromatografias preparativas e isolados os oligossacarídeos, duas cromatografia em papel Whatman nº1 foram realizadas para confirmar a pureza dos oligossacarídeos isolados, sendo uma corrida no mesmo solvente de corrida das preparativas e outra corrida na fase móvel 5:3:3 (*n*-butanol:piridina:água). Nos dois cromatogramas os oligossacarídeos apresentaram-se homogêneos, indicando que já estavam purificados. Os vários frascos contendo os oligossacarídeos isolados e homogêneos foram reunidos, e após serem liofilizados, eles foram pesados.

3.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

3.5.1 Hidrólise ácida total

Uma amostra de 5 mg foi tratada com ácido trifluoroacético M (TFA), durante 8 h a 100°C. Após a hidrólise o TFA foi removido do meio reacional por evaporação, até completa secura. Após estar seco, o material foi dissolvido em uma pequena quantidade de água, sendo retirada uma alíquota para análise por cromatografia ascendente em papel Whatman nº 1, usando como fase móvel o solvente *n*-butanol:piridina:água (5:3:3) (HOUGH & JONES, 1962a). O revelador utilizado foi nitrato de prata (TREVELYAN *et al.*, 1950). A solução restante foi reduzida com boroidreto de sódio ($NaBH_4$) e acetilada com anidrido acético:piridina (1:1, v/v) a 100°C (WOLFROM e THOMPSON, 1963a e b).

3.5.2 Redução e acetilação

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com NaBH_4 em temperatura ambiente por 16 h em pH 9-10 (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Transcorrido este período a solução foi neutralizada com solução de ácido acético 50%, tratada com resina catiônica e levada à secura em rotaevaporador sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi removido na forma de borato de trimetila pela dissolução e concomitante evaporação, com metanol.

Os alditóis formados foram acetilados com a mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v) a 100°C durante 1 h (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). A reação foi interrompida pela adição de água ao meio reacional. Os acetatos de alditóis gerados foram extraídos com clorofórmio. O ácido acético formado e a piridina foram removidos pela lavagem da fase clorofórmica com solução aquosa de sulfato de cobre 3%, repetidas vezes até não se notar mais a presença de piridina no meio; esta ausência pode ser verificada pela mudança de cor da solução de sulfato de cobre.

O clorofórmio foi desidratado com sulfato de sódio anidro, filtrado através de algodão e evaporado a temperatura ambiente. O material foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS; ver item 3.8.2, p. 22).

3.5.3 Dosagem de ácido urônico

A dosagem de ácido urônico foi realizada segundo a metodologia de FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). O polissacarídeo foi solubilizado em água para uma concentração de 10 mg/ml. A curva padrão foi feita com ácido glucurônico 100 $\mu\text{g/ml}$. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

Para as análises, em 400 μl de amostra, contida em tubo de ensaio, foram adicionados 40 μl de uma solução de ácido sulfâmico/sulfamato de potássio 4M.

Posteriormente 2,4 ml da solução tetraborato de potássio 75 mM, em ácido sulfúrico concentrado, foram adicionados. O tubo foi agitado vigorosamente com auxílio de Vórtex. Esta mistura foi aquecida em banho-maria fervente durante 20 min e em seguida resfriada. Depois disso, 80 μ l da solução de *m*-hidroxi-bifenil (Sigma) 0,15% em NaOH 0,5% foi adicionada para a produção do complexo colorido, que tem leitura no comprimento de onda de 525 nm.

3.6 REDUÇÃO DOS GRUPOS CARBOXILAS DO POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo original foi submetido ao método de carboxirredução para a verificação de qual ácido urônico estava presente na molécula. Este procedimento foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por TAYLOR e CONRAD (1972). Uma fração de 200 mg do polissacarídeo foi solubilizada no menor volume possível de tampão 0,2M MES (6 ml) e em seguida 0,72 g de carbodiimida, [ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida] (Sigma), foi sendo adicionado lentamente, sob agitação. Depois da carbodiimida ser adicionada esta solução permaneceu sob agitação por mais 2 h e, após decorrido este tempo, a solução foi levada até pH 7 pela adição de tampão TRIS/HCl 2M (4,7 ml). Com a solução em pH 7, foi adicionado NaBH₄ até a concentração de 2 M (0,81 g). A solução foi reduzida por 16 h e depois foi neutralizada com ácido acético aquoso 50%. A solução foi dialisada contra água corrente durante 48 h. Depois deste período, o material foi retirado da diálise, concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida e liofilizado.

Um segundo ciclo de carboxirredução foi iniciado supondo que 50% do conteúdo de carboxilas tinham sido reduzidas no primeiro ciclo. Novamente, após redução e diálise, o material foi concentrado e liofilizado, sendo posteriormente analisado por espectroscopia de RMN e metilação.

3.7 ANÁLISES DE METILAÇÃO

3.7.1 *Metilação*

As metilações foram feitas segundo CIUCANU e KEREK (1984). Uma fração de 5 mg do polissacarídeo foi dissolvida em dimetilsulfóxido (Me_2SO). Depois de ser completamente solubilizada, 2 ml de iodeto de metila foram adicionados e posteriormente foi adicionado NaOH em pó. Esta mistura foi agitada durante 30 min com auxílio de Vórtex. A mistura permaneceu durante 18 h em repouso para garantir o processo de metilação.

A reação foi interrompida pela adição de água no meio reacional, paralelamente com o resfriamento do sistema para evitar a formação de ácido iodídrico. Esta solução foi neutralizada com ácido acético aquoso 50% e solução diluída de ácido sulfúrico, para abaixar mais o pH e garantir que todas as unidades de ácido urônico ficassem na forma protonada e garantir a extração com clorofórmio. A fase clorofórmica foi lavada com água destilada para remoção de material inorgânico e Me_2SO . O clorofórmio foi evaporado e o material foi submetido a uma hidrólise branda com solução de HCl 3% em metanol (metanólise, ver item 3.7.2).

Os oligossacarídeos foram metilados segundo a mesma metodologia, diferindo somente na quantidade (1,0 mg). Os oligossacarídeos parcialmente metilados foram extraídos com clorofórmio e submetidos a metanólise também.

3.7.2 *Metanólise*

O material metilado, proveniente do passo anterior, foi submetido à metanólise com uma solução de ácido clorídrico 3% em metanol (2 ml), em frasco vedado à temperatura de 80°C durante 2 h (GORIN e IACOMINI, 1984). Os polissacarídeos parcialmente metilados e metanolizados foram neutralizados com carbonato de prata até sua neutralidade, verificado com papel de pH, para a

remoção do ácido na forma de cloreto de prata. Esta solução foi filtrada e evaporada até *secura* sob pressão reduzida em rotaevaporador. O material foi submetido a uma hidrólise total com ácido sulfúrico (ver item 3.7.3).

Os oligossacarídeos foram metanolizados conforme descrito anteriormente e submetidos a uma redução dos grupamentos carboxila com NaBD₄ em solução de NaOMe em metanol, para a estabilização do NaBD₄, seguido de hidrólise total, como descrito no item 3.7.3.

3.7.3 Hidrólise total do material per-O-metilado

A hidrólise completa do material O-metilado foi realizada com solução de ácido sulfúrico M a 100°C durante 14 h. Depois de hidrolisada, a solução foi neutralizada com carbonato de bário até pH 7, verificado através de papel de pH, filtrada e evaporada sob pressão reduzida em rotaevaporador. O material resultante foi ressuspenso em 0,5 ml de água destilada e NaBH₄ foi adicionado até pH 9-10. A mistura foi reduzida durante 16 h e em seguida neutralizada com solução de ácido acético aquoso 50%, passada por resina catiônica e filtrada. O material filtrado foi evaporado sob pressão reduzida em rotaevaporador e acetilado, como descrito anteriormente, com a mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v).

Os oligossacarídeos parcialmente metilados foram hidrolisados pela mesma técnica, extraídos com clorofórmio e, posteriormente, reduzidos com NaBD₄. Em seguida foram neutralizados e acetilados.

Os alditóis acetatos parcialmente metilados foram analisados por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa marca Varian, modelo Saturn 2000R em coluna capilar DB-225 (ver item 3.8.2, p. 22).

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.8.1 Cromatografia de partição em papel analítica e preparativa

Uma parte do material de hidrólise foi aplicado em papel Whatman nº 1 para a visualização dos produtos formados com a hidrólise ácida parcial. Foram preparadas duas cromatografias que foram corridas em dois sistemas diferentes de polaridades de fases móveis, sendo elas:

Sistema A: 5:3:3 (*n*-butanol:piridina:água) (HOUGH & JONES, 1962a)

Sistema B: 1:1:1 (*n*-butanol:piridina:água)

Estes sistemas revelaram a intensidade de hidrólise e qual sistema seria mais adequado para a separação dos oligossacarídeos formados. Estas cromatografias foram descendentes e depois de corridas por 24 horas foram reveladas com prata (nitrato de prata em acetona) (TREVELYAN *et al.*, 1950)

O material proveniente da hidrólise ácida parcial foi ressuspensado em água destilada e aplicado em folhas de papel Whatman nº 3 para o isolamento dos oligossacarídeos formados. Para estas cromatografias foi utilizado o sistema B (1:1:1 – *n*-butanol:piridina:água, v/v) para melhor separação dos componentes a serem isolados. Depois de corrida a cromatografia, foram retiradas as bordas do papel e reveladas conforme descrito anteriormente. As bandas referentes aos oligossacarídeos foram recortadas, picotadas e extraídas com água. Posteriormente, filtradas por papel de filtro por funil de Büchner, concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida e liofilizadas.

Depois de liofilizados, os oligossacarídeos foram novamente ressuspensos em 0,5 ml de água destilada transferidos para tubos Eppendorf e centrifugados a 10.000 rpm durante 3 min para a retirada de contaminante de celulose que estivesse presente. O sobrenadante era então transferido para um frasco, previamente pesado, e novamente liofilizado. Foram isolados dois oligossacarídeos denominados de “Oligo-1” e “Oligo-2”, com tempo de retenção em relação a lactose (R_{Lact}) de 0,72 e 0,27, respectivamente.

3.8.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS)

A cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectroscopia de massa foi realizada em cromatógrafo VARIAN, modelo Saturn 2000R – 3800 gas chromatography acoplado a um VARIAN, modelo Saturn 2000R – mass spectroscopy detector “Ion Trap”. A coluna utilizada foi a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm d.i x 0,25 µm de revestimento).

Hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,5 ml/min. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 50°C por 0,1 min, seguido pela elevação gradativa da mesma até 226°C, com aumento de 40°C/min, sendo mantida isotermicamente até o final da análise por 25 min. Este procedimento foi utilizado para a análise dos acetato de alditóis.

3.8.3 Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência com detector de espalhamento de luz de multiângulos (HPSEC-MALLS)

Os ensaios de homogeneidade foram realizados em aparelho da WYATT TECHNOLOGY adaptado com colunas ultragel 2000, 500, 250 e 120 acopladas a um refratômetro diferencial, modelo Waters 2410 e um detector de espalhamento de laser multiângulo a 632,8 nm, modelo Dawn DSP-F, que promove uma leitura do espalhamento de luz que é captado em diferentes intensidades, por diferentes ângulos. Como eluente, uma solução de 0,1M de NaNO₂ (nitrito de sódio) com NaN₃ (azida de sódio) 0,2 g/l, com fluxo controlado de 0,6 ml/min

As amostras foram solubilizadas na solução de nitrito para uma concentração final de 1 mg/ml, sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com diâmetro médio de poros de 0,2 µm. Uma quantidade de 250 µl foi injetada no

aparelho e os resultados foram fornecidos diretamente através de um computador acoplado ao sistema, utilizando o software ASTRA 4.70.07.

3.8.4 Análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C -RMN)

Os espectros de ^{13}C -RMN foram obtidos pelo uso de espectrômetro BRUKER 400 MHz, incorporados a transformador de Fourier, do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

As amostras foram solubilizadas em água deuterada (D_2O), ou em hidróxido de sódio dissolvido em D_2O (NaOD), quando insolúveis em água, e colocadas em tubos de 15 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro. As análises foram realizadas a 50°C e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, relativo a Me_4Si ($\delta=0$), utilizando como padrão externo a acetona ($\delta = 30,2$).

3.8.5 Espectrometria de massa – ESI-MS (Electrospray-ionisation-mass-spectrometry)

Para a análise do Oligo-2 foi necessário a técnica de espectrometria de massa de ESI que fornece uma informação segura da massa molecular. Utilizou-se o equipamento Micromass Quattro LC duplo quadrupolo. Os espectros foram gerados nos modos íon-positivo e íon-negativo. O solvente de análise foi água destilada com ácido fórmico a 0,05% (v/v): acetonitrila (1:1). A amostra foi diluída em água com ácido fórmico a 0,05% (v/v) e em seguida, diluída em acetonitrila, na proporção 1:1. Para a aquisição dos espectros dói utilizado uma faixa de massa de 100 a 900 m/z , inter-delay scan de 0,10 s e em sistema de aquisição de dados contínuo, tempo de aquisição de 1,60 s a 0,20 s.

3.8.6 Métodos analíticos gerais

- As pesagens foram realizadas em balança analítica ACCULAB, modelo LA-200 e V-1200.
- As evaporações e concentrações das soluções foram realizadas em rotaevaporador FISATOM, modelo 802, sob pressão reduzida, com temperaturas não superiores a 50°C.
- As liofilizações das soluções foram feitas em aparelho EDWARDS.
- As medidas e aferições de concentrações hidrogeniônicas (pH) foram procedidas em potenciômetro MICRONAL, modelo B222.
- As centrifugações foram realizadas em centrífuga HITACHI, modelo Himac CR21E (10.000 rpm, sob refrigeração a 15°C, durante 20 min).
- As determinações espectrofotométricas foram realizadas em aparelho HITACHI, modelo U-2001.
- Os reagentes e solventes utilizados apresentaram grau de pureza P.A.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 POLISSACARÍDEO ORIGINAL

O polissacarídeo foi isolado segundo a metodologia descrita em Materiais e Métodos (item 3.2, p 12). Quando este polissacarídeo foi dissolvido em água apresentou-se como uma solução de baixa viscosidade, quando comparada com uma solução de goma Ghatti na mesma concentração.

Depois de estar isolado, o polissacarídeo foi submetido a uma etapa de purificação pelo processo de congelamento e degelo, segundo GORIN e IACOMINI (1984). Após solubilização do polissacarídeo em água destilada e congelamento, durante o processo de descongelamento foi observada uma leve formação de precipitado. Este processo foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante se apresentasse límpido. Esta solução foi então, depois de descongelada, centrifugada, obtendo-se um sobrenadante e um precipitado. No precipitado, verificou-se a presença de proteínas, enquanto o sobrenadante não apresentou. Na fração do precipitado de congelamento e degelo foi dosado o teor de proteínas e teve como resultado uma concentração de 3%, segundo o método de BRADFORD (1976), no sobrenadante não foi detectado proteínas pelo mesmo método.

A partir deste ponto trabalhou-se somente com a fração purificada por congelamento e descongelamento, o sobrenadante; por apresentar um espectro com menos contaminantes e, mesmo que, uma pequena fração de proteína ter sido detectada, esta não interferiu nas análises subseqüentes.

O polissacarídeo proveniente do sobrenadante de congelamento e degelo foi, agora, submetido ao processo de purificação pelo método de precipitação com sal de amônio quaternário, Cetavlon. Este processo mostrou-se ineficaz para a purificação, pois grande parte do material inicial foi recuperado na primeira precipitação em pH 7. Em pH 8,5 e 10 não foi observado a formação de precipitado.

Logo após estas etapas de purificação o polissacarídeo foi analisado para sua homogeneidade pelo equipamento de espalhamento de luz (HPSEC-MALLS – High Performance Size Exclusion Chromatography – Multi-Angle Laser Light Scattering).

Por esta análise o polissacarídeo se apresentou como mostrado na Figura 2, onde dois picos são vistos no detector de índice de refração. Aparentemente estes dois picos muito próximos acabam formando um “ombro”, indicando que se trata da formação de um agregado molecular. Isto está de acordo com o que foi dito por ASPINALL (1969), que polissacarídeos ácidos podem formar agregados e ter seu peso molecular aumentado. Para o detector de espalhamento de luz podemos notar a presença de dois picos também, onde um está sobreposto ao pico do agregado, indicando que esta molécula está em grande concentração, enquanto que o outro não coincide com nenhum pico, podendo ser esclarecido como um agregado maior que está em menor concentração. Este experimento foi repetido, tentando-se fazer uma descomplexação do polissacarídeo com solução de uréia 6M. Para tanto, dissolveu-se o polissacarídeo em uma solução de uréia 6M e esta solução permaneceu sob agitação durante 24 h e em seguida colocada em diálise fechada com água destilada (ou Milli-Q) para evitar-se a entrada de muitos íons na solução, favorecendo assim a formação de novos agregados. A água da diálise foi trocada várias vezes durante o dia, permanecendo durante 4 dias para garantir que toda a uréia tivesse sido retirada. Este processo mostrou-se ineficaz, visto que o espectro de HPSEC mostrou-se idêntico ao anterior, demonstrando que este agregado molecular, uma vez formado, é muito resistente e é necessária uma força muito maior para ser desfeito.

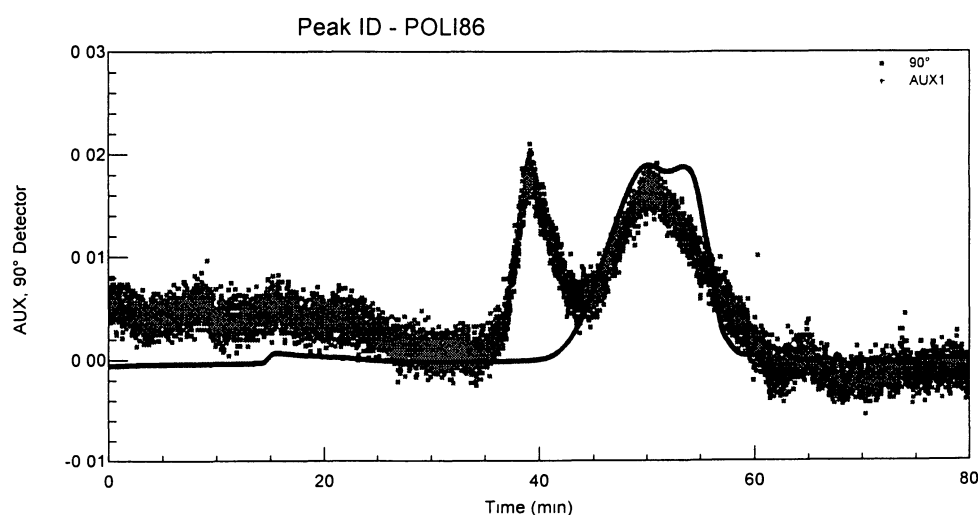


Figura 2: Espectro de HPSEC-MALLS obtido do polissacarídeo de *Vochysia* sp, dissolvido em solução de nitrito de sódio 0,1M.

Uma fração de 5 mg deste polissacarídeo foi hidrolisada conforme a técnica descrita em Materiais e Métodos (item 3.5.1, p. 16). Os alditóis livres foram derivatizados para acetatos de alditóis e analisados por GC-MS. A análise desta hidrólise forneceu os seguintes resultados, indicados na Tabela 1, que foram compatíveis com os resultados obtidos da cromatografia em papel:

Tabela 1 - Análise dos alditóis acetatos^a obtidos do polissacarídeo extraído da goma de *Vochysia* sp.

Monossacarídeos	Polissacarídeo original(%)
Arabinose	23
Manose	42
Galactose	15
Glucose	20

a – Alditóis acetatos foram obtidos depois da hidrólise total, redução e acetilação, e foram analisados por GC-MS (coluna DB-225);

Apesar dos resultados entre a análise por GC-MS e por cromatografia em papel apresentarem praticamente o mesmo resultado, a cromatografia em papel revelou a presença de ácido urônico na amostra, o que não é mostrado pelo GC-MS, quando se utiliza a coluna e o método em questão.

Diante deste fato foi realizada a dosagem de ácido urônico pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Por esta reação foi determinado que o percentual de ácido urônico na amostra do polissacarídeo Poli86 era de 30%, logo foi necessário recalcular as demais concentrações dos monossacarídeos ajustando os demais monossacarídeos para um conteúdo de açúcar neutro de 70%, ficando com as seguintes concentrações (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise dos alditóis acetatos^a obtidos do polissacarídeo extraído da goma de *Vochysia* sp., após dosagem de ácido urônico

Monossacarídeos ^a	Polissacarídeo original (%)
Ácido urônico ^b	30
Arabinose	16,4
Manose	29,7
Galactose	10,4
Glucose	13,5

a – Alditóis acetatos foram obtidos depois da hidrólise total, redução e acetilação, e foram analisados por GC-MS (coluna DB225),

b – Ácido urônico foi dosado pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991

4.2 POLISSACARÍDEO CARBOXIRREDUZIDO

Como o polissacarídeo apresentou 30% de ácido urônico, foi interessante realizar-se a carboxirredução dos grupamentos ácidos presentes na molécula. Para tanto se utilizou o método de TAYLOR e CONRAD, 1972. O polissacarídeo sofreu o tratamento com carbodiimida duas vezes para garantir a total redução, pois a porcentagem de 30% para ácido urônico é grande e estes grupos poderiam não estar totalmente acessíveis ao ataque do reativo. Desta forma, após o término da reação, o polissacarídeo carboxirreduzido foi analisado para confirmar o sucesso do processo, sendo, novamente, realizada a dosagem de ácido urônico pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991. Esta dosagem forneceu resultado de ácido urônico igual a zero, estando a concentração abaixo do limite de detecção de método, onde a mínima quantidade de carboxila presente que pode ser detectada é de 1 µg/ml, ou seja, o processo de carboxirredução foi eficiente para a total redução.

Com a dosagem de ácido urônico para confirmar a completa carboxirredução era de grande interesse saber qual era o monossacarídeo de compunha esta unidade ácida – glucose ou galactose. Para esclarecer esta suspeita foi feita, a partir do polissacarídeo carboxirreduzido, uma hidrólise ácida total com TFA 1M, durante 8 h a 100°C. O resultado está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição monossacarídica do polissacarídeo original e carboxirreduzido de *Vochysia* sp.

Monossacarídeos ^a	Polissacarídeo Original (%)	Polissacarídeo Carboxirreduzido ^b (%)
Ácido urônico ^b	30	0
Arabinose	16	13
Manose	30	35
Galactose	10	7
Glucose	14	45

a – Alditóis acetatos obtidos por hidrólise ácida com TFA M, 8 h, 100°C e analisados por GC-MS em coluna DB225

b – Carboxirredução realizada segundo a metodologia de TAYLOR e CONRAD, 1972

Podemos concluir com os dados apresentados acima que o ácido urônico em questão é o ácido glucurônico, pois no polissacarídeo original temos apenas 14% de glucose e após este polissacarídeo sofrer a carboxirredução ocorreu um aumento de aproximadamente 30% na porcentagem de glucose, que totalizou 45%. AKIYAMA *et al.* (1984) demonstrou através do mesmo método, e da mesma forma, que na arabinoglucuronomanana do polissacarídeo extracelular de uma cultura de células de tabaco, também estava presente o ácido glucurônico.

4.3 ANÁLISE DOS DADOS DE METILAÇÃO

Os polissacarídeos, original e carboxirreduzido, foram metilados segundo a metodologia de CIUCANU e KEREK (1984), pois eram polissacarídeos solúveis em Me₂SO. Após passarem pela etapa de metilação, eles foram extraídos com clorofórmio, metanolizados, hidrolizados e, finalmente, reduzidos e acetilados. Os alditóis acetatos parcialmente metilados foram analisados através de GC-MS (BARRETO-BERGTER *et al.*, 1981) e os resultados obtidos estão tabulados na Tabela 4.

Tabela 4 - Alditóis acetatos parcialmente metilados obtidos dos polissacarídeos original e carboxirreduzido.

Derivados metilados	Tempo de retenção	Polissacarídeo Original (%)	Polissacarídeo Carboxirreduzido (%)
2,3,5-Me ₃ -Ara	7.152	6.4	3.0
2,3,4-Me ₃ -Ara	7.557	-	1.0
3,5-Me ₂ -Ara	8.370	2.5	1.0
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	8.795	1.7	1.8
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	8.882	4.5	1.0
3-Me-Ara	8.979	5.0	-
2,3- Me ₂ -Ara	9.152	5.0	-
2,5-Me ₂ -Ara	9.250	-	1.0
3,4,6-Me ₃ -Man	10.991	48.0	43.0
2,4,6-Me ₃ -Glc	11.515	2.5	2.0
2,3,6-Me ₃ -Glc	12.065	5.5	33.0
Ara-pentacetato	13.175	5.0	-
4,6-Me ₂ -Man	13.640	5.0	5.6
2,6-Me ₂ -Gal	14.074	3.4	3.8
2-Me-Ara	15.121	4.5	4.0

Fica evidente nos resultados que no polissacarídeo original, onde não são analisados os derivados metilados provenientes dos ácidos urônicos, que o pico de maior porcentagem refere-se ao derivado 3,4,6-Me₃-Man, o que corresponde as unidades de manose com substituição O-2. Já nos resultados do polissacarídeo carboxirreduzido verificamos a presença do mesmo derivado para a manose e temos agora o derivado do ácido glucurônico sendo analisado como seu açúcar neutro, a glucose, e este pico tem como derivado 2,3,6-Me₃-Glc, que nos indica que o ácido glucurônico está substituído O-4. Podemos ainda notar a presença de unidades de manose substituída em O-2 e O-3, tanto no polissacarídeo original quanto no carboxirreduzido. Isto está de acordo com estruturas propostas onde as unidades de manose podem ser substituídas por unidades de arabinose ou galactose na posição 3 (GOWDA, 1983). Como os resultados obtidos por metilação indicam que as maiores porcentagens são dos derivados pertencentes à cadeia principal, manose e ácido glucurônico, podemos dizer que as unidades de arabinose, galactose e glucose estão substituindo as unidades de manose e ácido glucurônico da cadeia principal. Isto é verdadeiro, pois podemos notar a presença de terminais não redutores de glucose, galactose e arabinose. Com estes resultados podemos imaginar uma estrutura onde na cadeia principal encontram-se as unidades de manose e ácido glucurônico, sendo estas substituídas em O-2 e O-4, respectivamente, e as unidades manose podem ser substituídas O-3 por unidades de arabinose, demonstrado pelo derivado 4,6-Me₂-Man. Galactose e glucose podem estar substituindo as unidades de arabinose, visto que estão presentes os derivados de arabinose mono, di e tri-substituídas.

4.4 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Mesmo o polissacarídeo ter se apresentado como um agregado pelas análises de HPSEC-MALLS, a amostra foi preparada para o RMN, pois acreditou-se que, sendo a mesma molécula em forma de agregado, não ocorreria interferências nos dados de RMN. O resultado da análise revelou um espectro muito simples (Figura 3), pois esta goma apresentou apenas dois sinais na região de C-1, o que é

incomum para gomas, onde aparecem múltiplos picos na região de C-1 (ASPINALL, 1969; STEPHEN, 1983; DEFAYE e WONG, 1986; LEÓN de PINTO, 1991; DELGOBO *et al.*, 1998), e deixando a primeira impressão da existência de uma estrutura dissacarídica repetitiva. Estes sinais puderam ser apontados para alguns monossacarídeos de acordo com a composição monossacarídica. Os sinais em δ 99,3 e 101,5 correspondem ao C-1 das unidades de D-Manp e β -D-GlcpA e o sinal em δ 174,8 ao C-6 das carboxilas das unidades de ácido urônico .

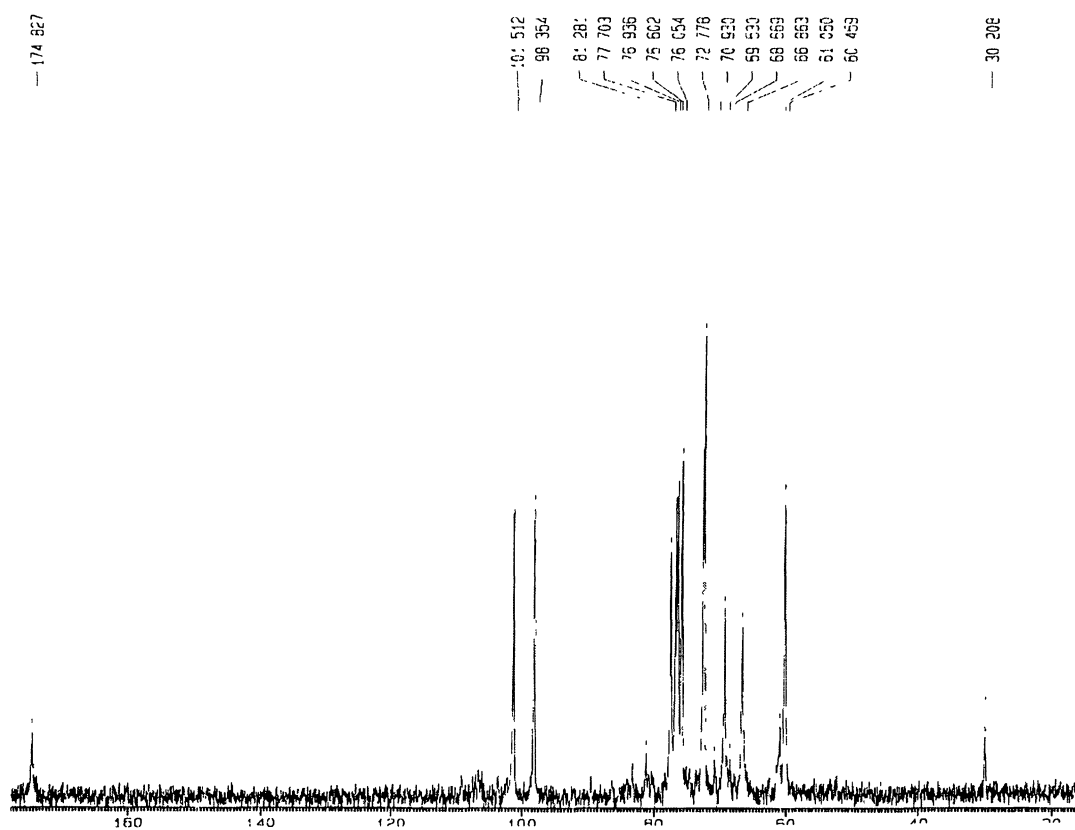


Figura 3: Espectro de ^{13}C -RMN obtido do polissacarídeo de *Vochysia* sp. (Quaruba). Experimento realizado em probe de 5 mm, a 30°C. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm.

Este polissacarídeo foi agora submetido à carboxirredução e além da dosagem de ácido urônico ter resultado igual a zero, este dado foi confirmado pelo desaparecimento do pico correspondente ao C-6 de ácidos urônicos que tem um deslocamento químico na região de 174-175 ppm. E como podemos notar pelo espectro de RMN, isto realmente aconteceu. (Figura 4)

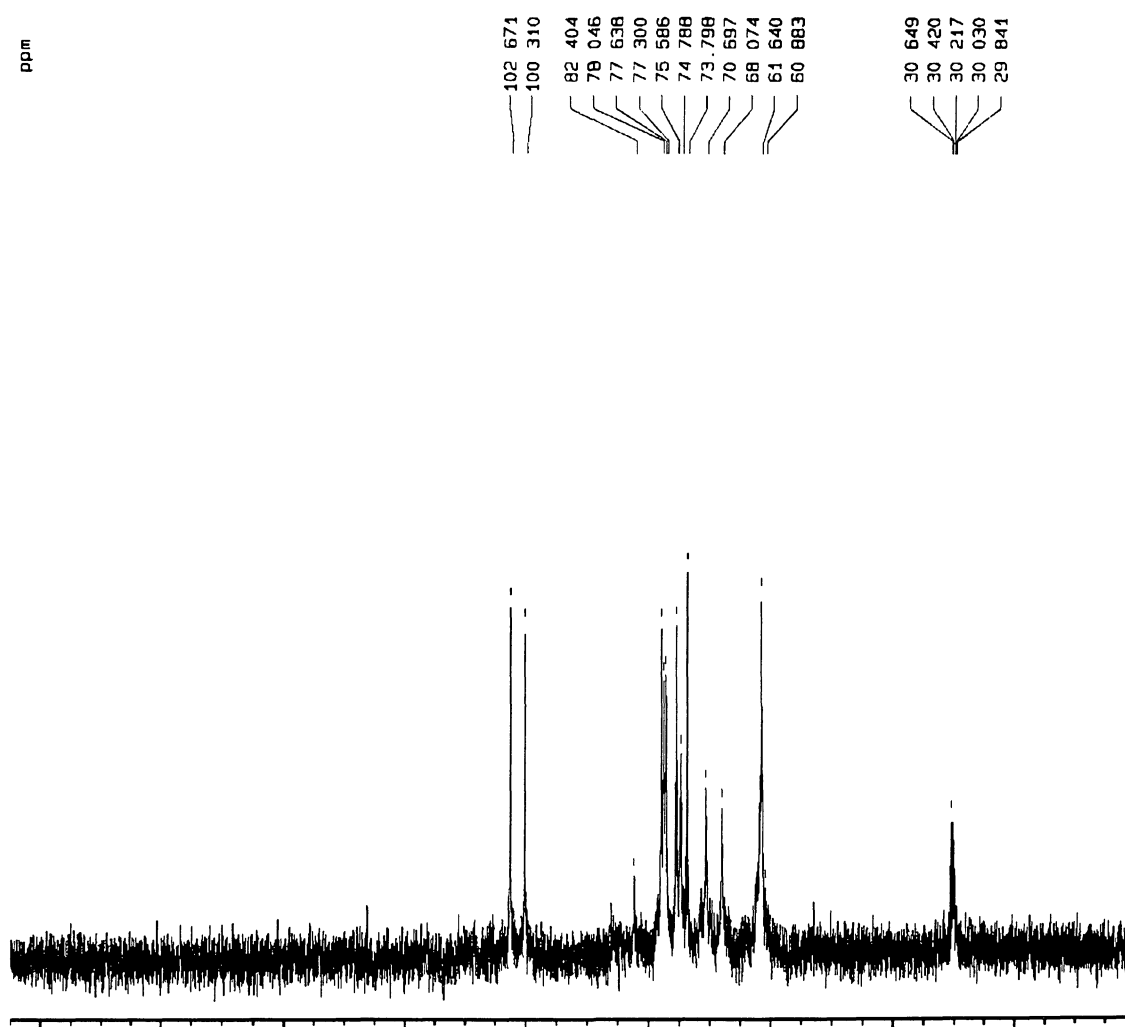


Figura 4: Espectro do polissacarídeo de *Vochysia* sp, obtido após dois ciclos de carboxirredução. Espectro gerado em probe de 5mm, a 30°C, polissacarídeo solubilizado em NaOD 0,5M. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm.

Com um espectro simples e os dados de metilação para confirmar o espectro, podemos dizer que esta estrutura apresenta-se como uma cadeia principal de α -D-Manp ligada O-2, unida com unidades de ácido glucurônico ligada em O-4. Como o espectro na região de carbono anomérico mostrou apenas dois sinais e os dados de metilação mostram quantidades aproximadas dos derivados metilados de 3,4,6-Me₃-Man e 2,3,6-Me₃-Glc, podemos dizer que esta estrutura é alternada e repetitiva.

4.5 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS CONTENDO ÁCIDO URÔNICO

Com a alta taxa de ácido glucurônico presente na molécula original e um espectro de RMN que apresenta tão poucos sinais na região de C-1, foi grande o interesse em produzir oligossacarídeos contendo ácido urônico para tentar descobrir a unidade repetitiva da molécula.

Os oligossacarídeos isolados por cromatografia preparativa em papel tiveram um rendimento elevado, pois, para o Oligo-1 e para o Oligo-2, foi obtido 14% (140 mg) e 10% (103 mg) de rendimento respectivamente. Depois eles foram submetidos à análise de metilação e RMN, sendo realizado espectros de ¹³C, ¹H, HMQC e COSY. E as técnicas de TOCSY e ROESY somente para o Oligo-2.

4.5.1 Análise do oligossacarídeo Oligo-1

O Oligo-1 foi isolado por cromatografia preparativa em papel, tendo um $R_{Lact} = 0,72$. A metilação do Oligo-1 forneceu como resultado a presença do derivado 3,4,6-Me₃-Man indicando uma unidade de manose substituída em O-2. Com a fração metilada e transformada em metil éster, reduzida com NaOMe-NaBD₄ em metanol, foi verificada a presença do mesmo derivado, mas não foi possível visualizar a presença do derivado que seria correspondente à unidade de glucose, o derivado 2,3-Me₂-Glc. Desta forma podemos dizer que a unidade de manose é a extremidade

reduzora e que a unidade de ácido glucurônico, terminal não redutor, está substituindo esta unidade na posição 2.

Os espectros de ressonância do oligossacarídeo Oligo-1 apresentaram-se simples e com poucos sinais, sendo compatíveis com um espectro de um dissacarídeo. Alguns sinais comprovam esta hipótese, como os sinais de ^{13}C -RMN (Figura 5) em δ 101.6, δ 93.7 e δ 92.0, que correspondem aos C-1 de β -D-GlcpA, β -D-Manp e α -D-Manp, respectivamente, assinalados de acordo com GORIN e MAZUREK (1974); LEÓN de PINTO *et al.* (1997); DEFAYE e WONG (1986); JASEJA *et al.* (1989). O sinal em δ 103,5 corresponde ao C-1 de β -GlcpA ligado na unidade de β -Man.

O espectro de ^1H -RMN também confirma que este oligossacarídeo trata-se de um dissacarídeo, onde tanto a integração dos picos, quanto os deslocamentos químicos em δ 5,2; δ 4,9 e δ 4,5 que correspondem aos H-1 de unidades de α -D-Manp, β -D-Manp e β -D-GlcpA, respectivamente (OGAWA *et al.*, 1999; JASEJA *et al.*, 1989), suportam a hipótese levantada.

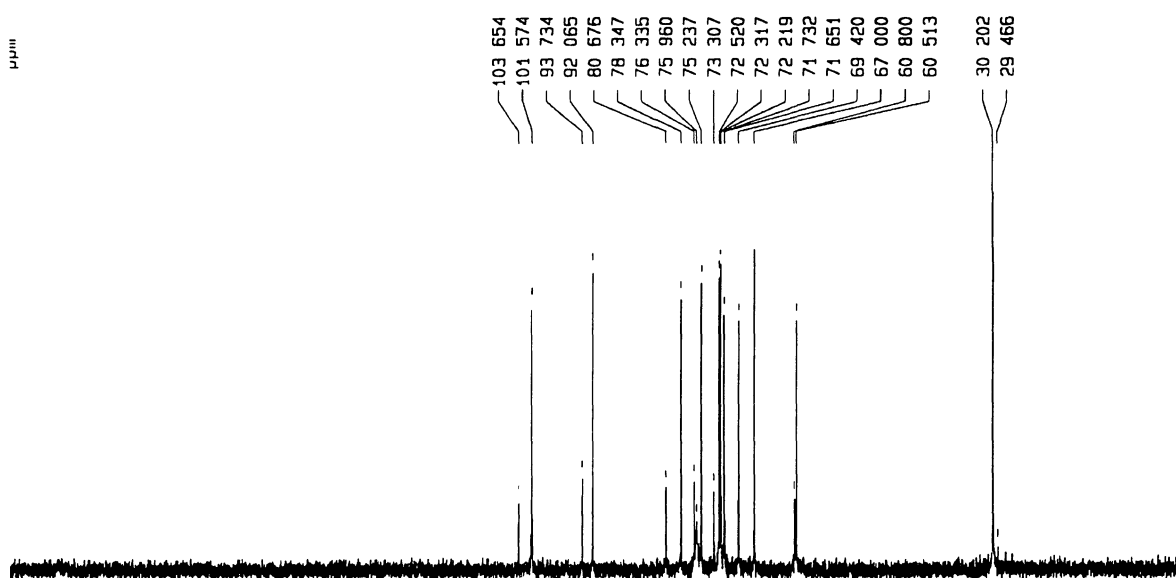


Figura 5: Espectro de RMN de ^{13}C obtido do Oligo-1, em probe de 5 mm, a 30°C e dissolvido em D_2O . Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Com os espectros de HMQC (Figura 6, p. 37) e COSY (Figura 7, p. 38) foi possível fazer os assinalamentos de alguns sinais, sendo melhor visualizados na Tabela 6.

Tabela 5: Assinalamentos dos deslocamentos químicos (δ) em ppm do oligossacarídeo Oligo-1 obtidos por análise dos espectros de HMQC e COSY

Unidades	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
β -D-GlcpA(1 \rightarrow	101,61	72,53	75,25	73,31	67,0	175,17
	4,52	3,82	3,57	3,82	3,72	-
\rightarrow 2)- α -D-Manp	92,07	78,41	69,42	76,31	71,78	60,50
	5,29	4,08	3,89	3,74	3,53	3,82
\rightarrow 2)- β -D-Manp	93,73	80,69	72,31	75,93	-	60,78
	4,97	4,15	3,69	3,380	-	-

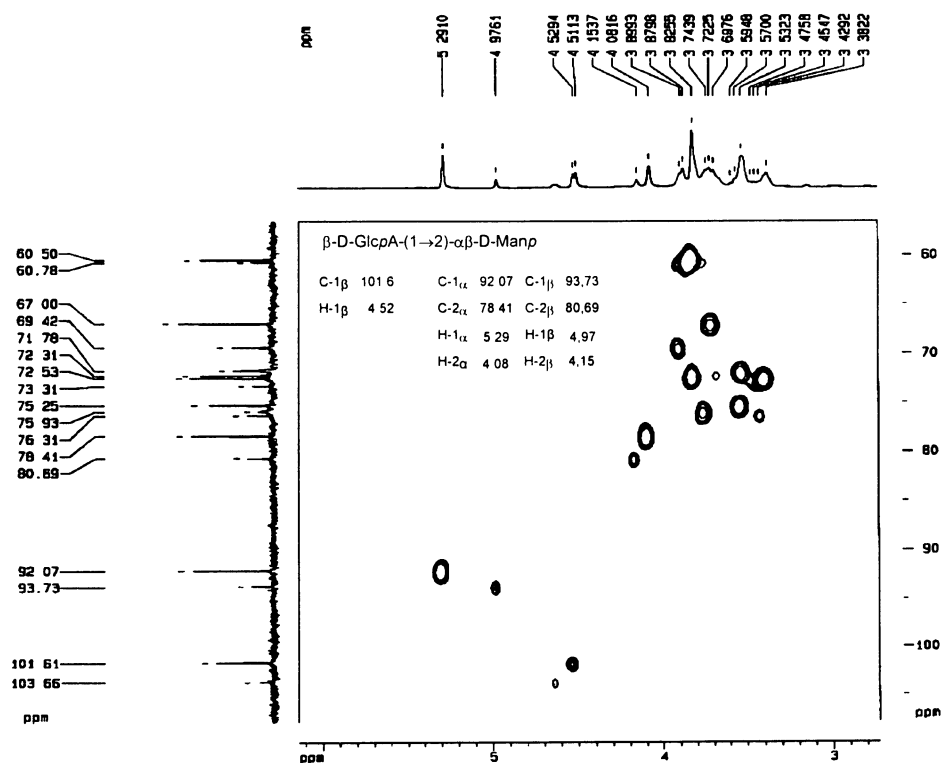


Figura 6: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ (HMQC) do Oligo-1. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Desta forma podemos deduzir que o oligossacarídeo Oligo-1 trata-se de um dissacarídeo composto por β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp, pois através dos deslocamentos químicos observados para a unidade de manose pode-se inferir que ela é terminal redutor e está substituída em C-2, enquanto o ácido glucurônico é terminal não redutor e encontra-se ligado tanto à unidade de α -D-Manp, quanto à unidade de β -D-Manp, estando a primeira com maior intensidade que a segunda.

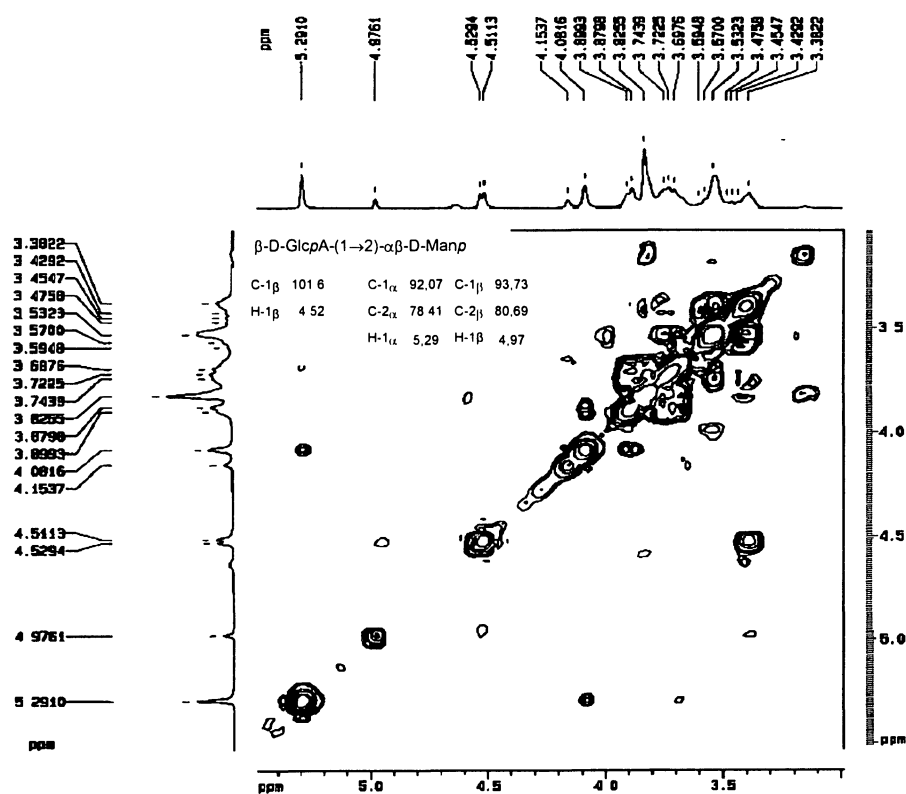


Figura 7: Espectro de RMN de correlação $^1\text{H}, ^1\text{H}$ (COSY) do Oligo-1. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

4.5.2 Análise do oligossacarídeo Oligo-2

O Oligo-2 também foi isolado por cromatografia preparativa em papel, que apresentou um $R_{Lact} = 0,27$. As análises de metilação do Oligo-2 também forneceram resultados parciais, pois foi verificada a presença do derivado 3,4,6-Me₃-Man somente. A fração reduzida com NaOMe-NaBD₄, em metanol, não mostrou a presença dos derivados 2,3,4,6-Me₄-Glc e 2,3,6-Me₃-Glc, que corresponderiam as unidades de ácido glucurônico terminal e interna do oligossacarídeo, respectivamente.

Pela análise dos dados obtidos por ¹³C-RMN, este oligossacarídeo apresentou-se um pouco mais complexo que o primeiro (Figura 8, p. 40). Podemos notar que alguns sinais são correspondentes ao dissacarídeo anterior, como os sinais em δ 101,37 que é correspondente ao C-1 da unidade de ácido glucurônico ligado em C-2 da unidade de α -manose redutora (ICHIKAWA, 2001; MORI, 1981; DI FABIO, 1982; GORIN e MARUZEK, 1975). Os sinais em δ 91,98 e δ 93,66 correspondem ao C-1 de α - e β -manopirranose redutora, enquanto que o sinal em δ 98,30 corresponde ao sinal de C-1 da unidade de manose não redutora. O sinal em δ 101,53 pode ser atribuído ao C-1 da outra unidade de ácido glucurônico. Estes sinais puderam ser confirmados pela análise do espectro de heterocorrelação (HMQC – Figura 10, p. 42), onde o sinal de H-1 da unidade de manose redutora, em δ 5,26; correlaciona-se com o sinal em δ 91,98 (C-1). O sinal de H-1 em δ 5,40 da unidade de α -Man não redutora correlaciona-se com o sinal em δ 98,30 (C-1). E os sinais de H-1 em δ 4,48 e δ 4,18 correlacionam-se com os sinais em δ 101,53 e δ 101,37; que são correspondentes aos sinais de C-1 das unidades de ácido glucurônico.

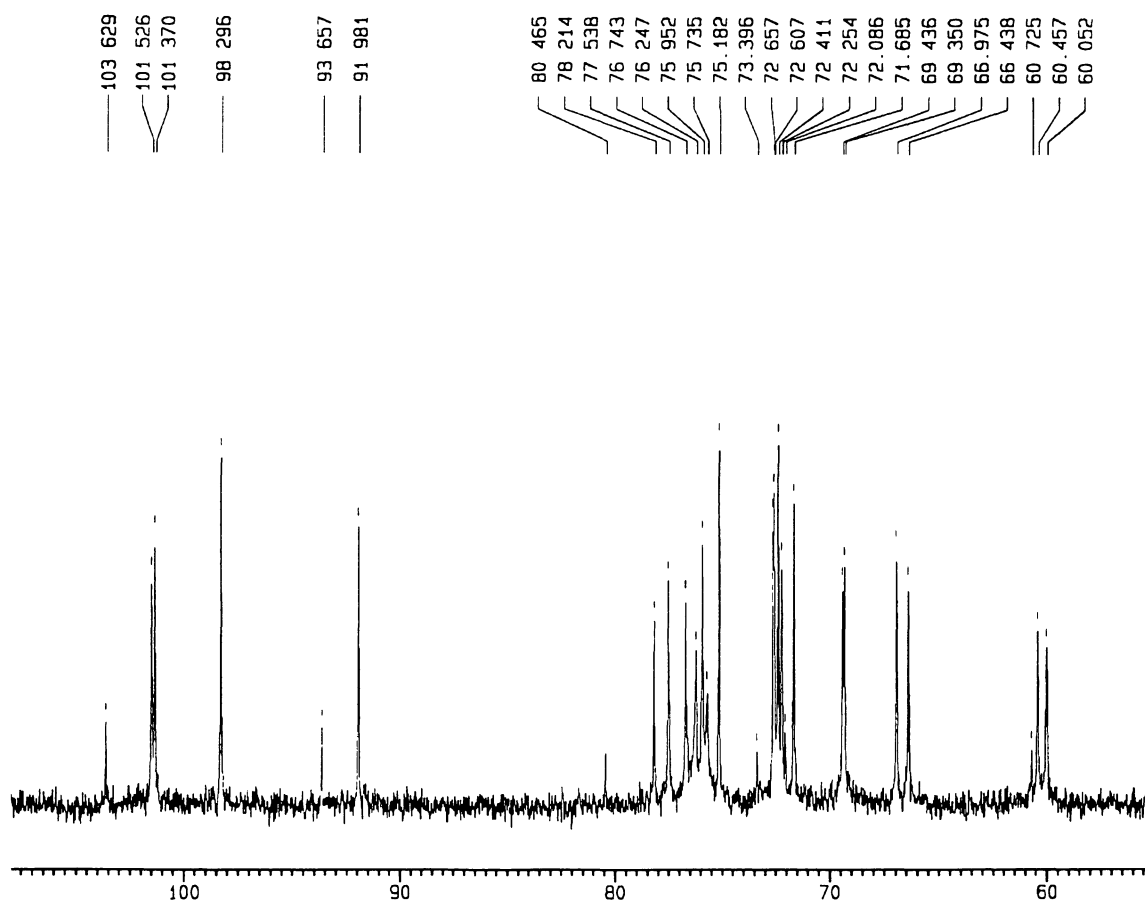


Figura 8: Espectro de RMN de ^{13}C do Oligo-2, em probe de 5 mm, a 30°C e dissolvido em D_2O . Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Usando-se o espectro de COSY (Figura 9, p. 41), foi possível estabelecer quais eram os prótons de cada unidade, e assim, chegou-se até H-2 das unidades de manose e até H-4 das unidades de ácido glucurônico, pois a partir destes começaram a ocorrer sobreposições de sinais, o que dificultou concluir quais sinais pertenciam a cada unidade. Os sinais que puderam ser determinados são demonstrados na Tabela 6:

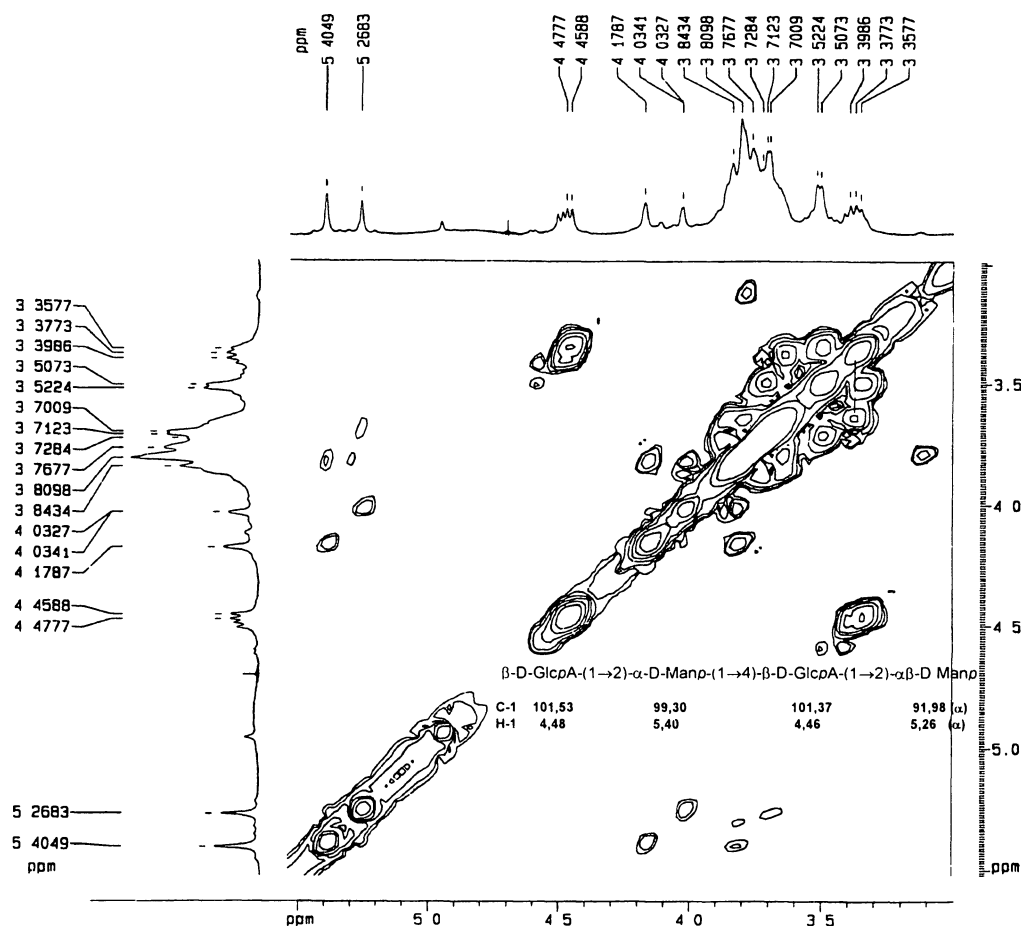


Figura 9: Espectro de RMN de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ (COSY) do Oligo-2. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Tabela 6: Assinalamentos dos prótons de cada unidade do Oligo-2, baseado nos espectros de COSY e HMQC

Unidades	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4
→2)- α -D-Manp	5,26	4,03	-	-
	91,98	78,21	-	-
→4)- β -D-GlcpA-(1→	4,46	3,36	3,67	3,78
	101,37	72,41	66,44	76,25
→2)- α -D-Manp-(1→	5,40	4,03	-	-
	98,30	78,21	-	-
β -D-GlcpA(1→	4,48	3,38	3,71	3,52
	101,53	72,25	66,98	71,68

Com os prótons e carbonos assinalados para cada unidade, os espectros de TOCSY e ROESY serviram para a confirmação destes e verificar a seqüência das unidades. Pelo espectro de ROESY (Figura 12, p. 44) foi possível observar o acoplamento homonuclear de H-1 da unidade de β -D-GlcpA' (δ 4,46) com o H-1 da unidade de α -D-Manp redutora (δ 5,26), e ainda o acoplamento com o H-1 da unidade de β -D-GlcpA' (δ 3,36) com o H-2 da unidade de α -D-Manp redutora (δ 4,03), demonstrando desta forma que a unidade de manose redutora está realmente substituída em C-2.

Para a unidade de α -D-Manp não redutora existe o acoplamento de H-1 desta (δ 5,40) com o H-1 da unidade de β -D-GlcpA terminal (δ 4,48) e com o H-4 da unidade de β -D-GlcpA'. Ainda é possível verificar o acoplamento de H-2 (δ 4,18) de α -D-Manp não redutora com o H-1 de β -D-GlcpA terminal (δ 4,48). O acoplamento de H-1 de α -D-Manp (δ 5,40) e H-3 da unidade de β -D-GlcpA' intermediária (δ 3,67), também pode ser visualizado.

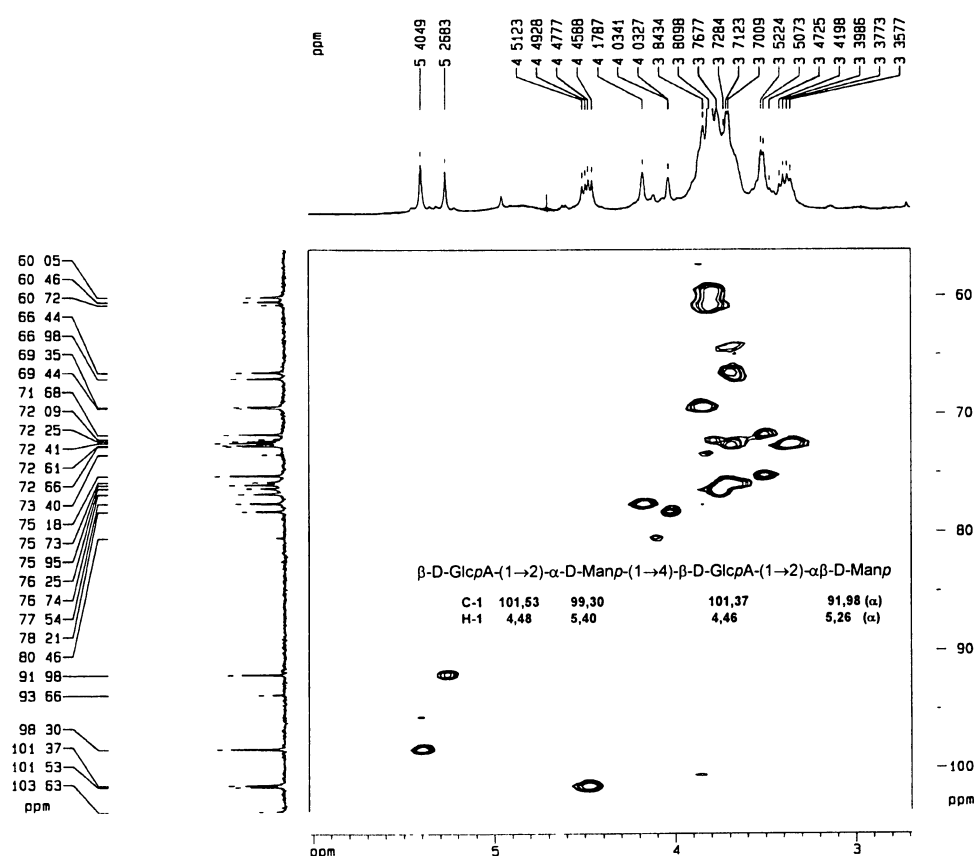


Figura 10: Espectro de RMN de correlação $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ (HMQC) do Oligo-2. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Pelo espectro de TOCSY (Figura 11, p. 43) que estabelece o acoplamento homonuclear intranuclear, foi possível observar que para as unidades de manose ocorre o acoplamento entre H-1 e H-2, sendo que H-1 de α -D-Manp redutora (δ 5,26) acopla com H-2 (δ 4,03), e para a unidade de α -D-Manp não redutora, seu H-1 (δ 5,40) acopla com o H-2 (δ 4,18). A unidade de β -D-GlcpA terminal mostra o acoplamento do seu H-1 (δ 4,48) com H-3 (δ 3,71) e para a unidade de β -D-GlcpA não terminal o acoplamento de H-1 (δ 4,46) com o seu H-2 (δ 3,36).

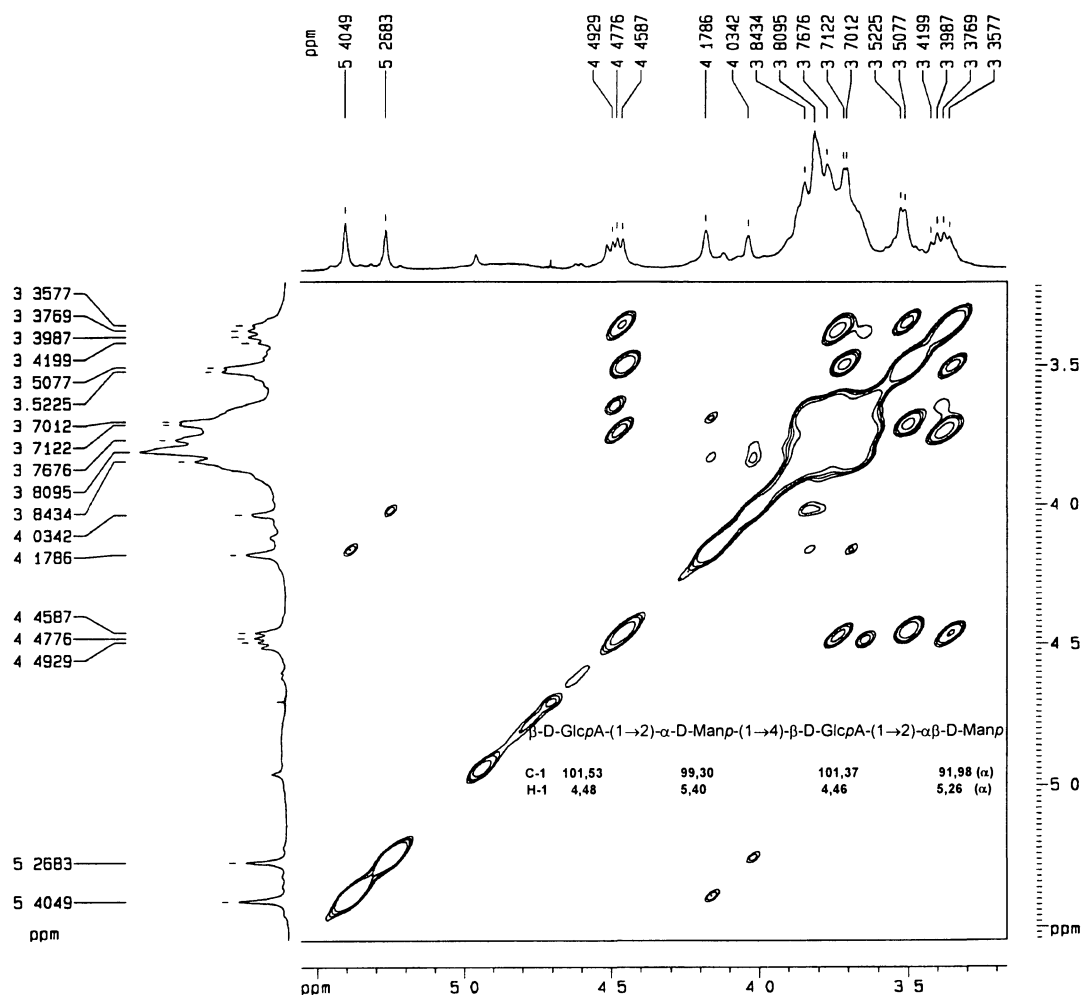


Figura 11: Espectro de RMN de correlação $^1\text{H}, ^1\text{H}$ (TOCSY) do Oligo-2. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Com os dados apresentados é possível estabelecer que o oligossacarídeo Oligo-2 apresenta 4 unidades, que foram quantificadas através do espectro de próton. Foi possível estabelecer a seqüência destas unidades analisando-se os espectros bidimensionais de ROESY, TOCSY, HMQC e COSY e chegar a uma estrutura alternada de manose e ácido glucurônico, onde a manose apresenta-se como terminal redutor e o ácido glucurônico como terminal não redutor, β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp.

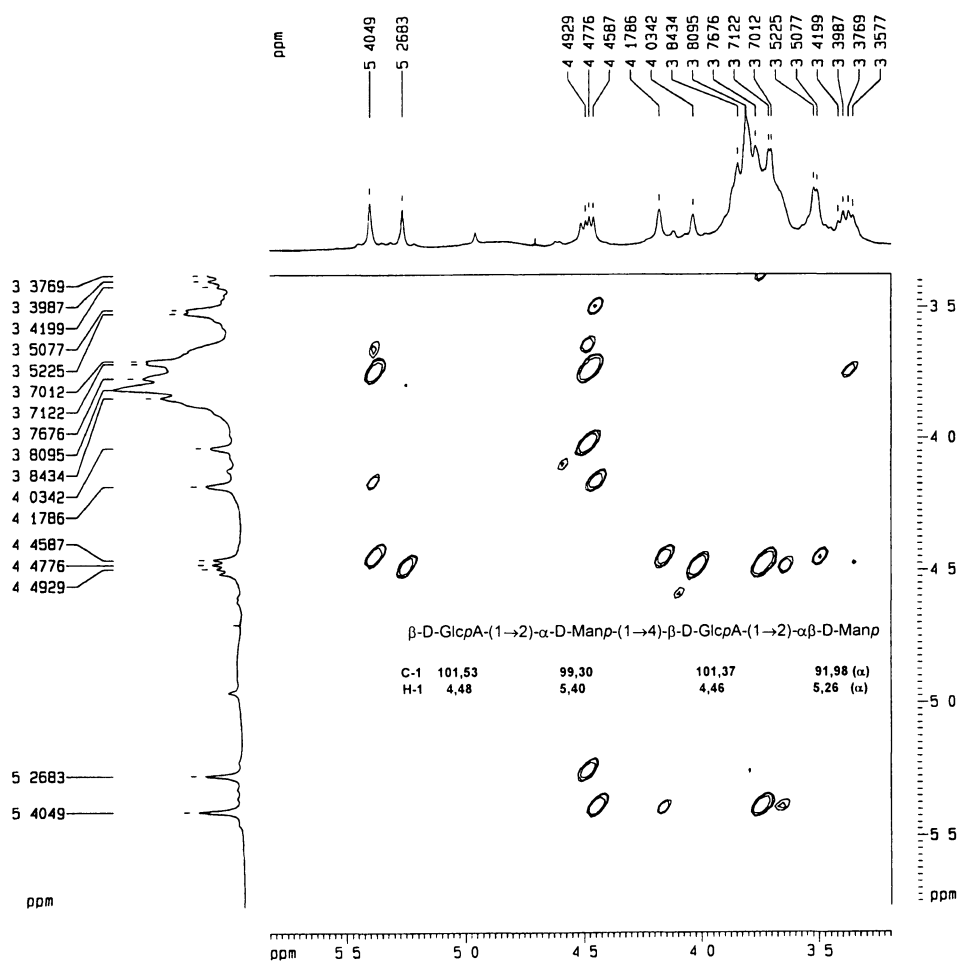


Figura 12: Espectro de RMN de correlação $^1\text{H}/^1\text{H}$ (ROESY) do Oligo-2. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

A estrutura deste tetrassacarídeo foi confirmada pela técnica de electron-spray, onde o pico do íon molecular com relação m/z 695, no modo positivo, corresponde exatamente às duas unidades de ácido glucurônico e às duas unidades de manose acrescidas de um próton. A fragmentação feita em cima deste pico gerou picos-filhos (Figura 13, p. 46, scan +ve), que pode ser esclarecida como a retirada da unidade de manose ($m = 162$) do terminal redutor, que gera o fragmento de relação m/z 533 e, acrescentando-se um íon de sódio ($m = 23$) e retirando-se um próton ($m = 1$), tem-se o fragmento com relação m/z 555. O próximo fragmento, resulta da quebra deste último, em uma unidade de ácido glucurônico ($m = 176$) e acrescentando-se mais um íon de sódio e outro de potássio, resultando no fragmento de relação m/z 441 (Figura 14-A, p. 47).

No modo negativo (Figura 13, p. 46, scan -ve) o íon molecular com relação m/z 693 corresponde ao mesmo tetrassacarídeo acima, com a perda de um próton. Também foi feito um bombardeamento em cima deste pico, gerando picos-filhos (Figura 13, p.45, scan -ve) e pode-se observar dois perfis de fragmentação. A partir do tetrassacarídeo, pode ocorrer a perda de uma unidade de manose para dar origem ao fragmento de relação m/z 531, seguida da retirada de uma unidade de ácido glucurônico que gera o pico m/z 355 e enfim ocorre a retirada de uma unidade de manose para gerar o pico m/z 193 (Figura 14-B, p. 47). O outro perfil de fragmentação ocorre com a perda de uma molécula de água ($m = 18$) da unidade de ácido glucurônico interior do oligossacarídeo, entre as hidroxilas da carbonila e de C-3 que irá proporcionar uma melhor estabilização do intermediário formado, e dá origem ao pico com m/z 675. A partir deste ocorre a perda de uma unidade de manose que gera o pico m/z 513, ou ocorre a perda da unidade de ácido glucurônico do terminal não redutor que irá formar o pico de m/z 499. Pelo espectro a primeira opção ocorre com maior frequência pela intensidade do pico m/z 513. Então, a partir do pico m/z 513 ocorre a perda de uma unidade de ácido glucurônico e dá origem ao pico m/z 337, e enfim, deste último ocorre a perda de uma unidade de manose e dá origem ao pico m/z 175 (Figura 14-C, p. 47). Pela outra hipótese, o pico m/z 499 pode perder uma unidade de manose e gerar o pico m/z 337, e por fim, este perder uma unidade de manose e gerar o pico m/z 175 (Figura 14, p. 46).

Por esta análise fica comprovado não só a presença de quatro unidades monossacarídicas no oligossacarídeo como a seqüência destas unidades, cooperando para a elucidação da estrutura química desta molécula.

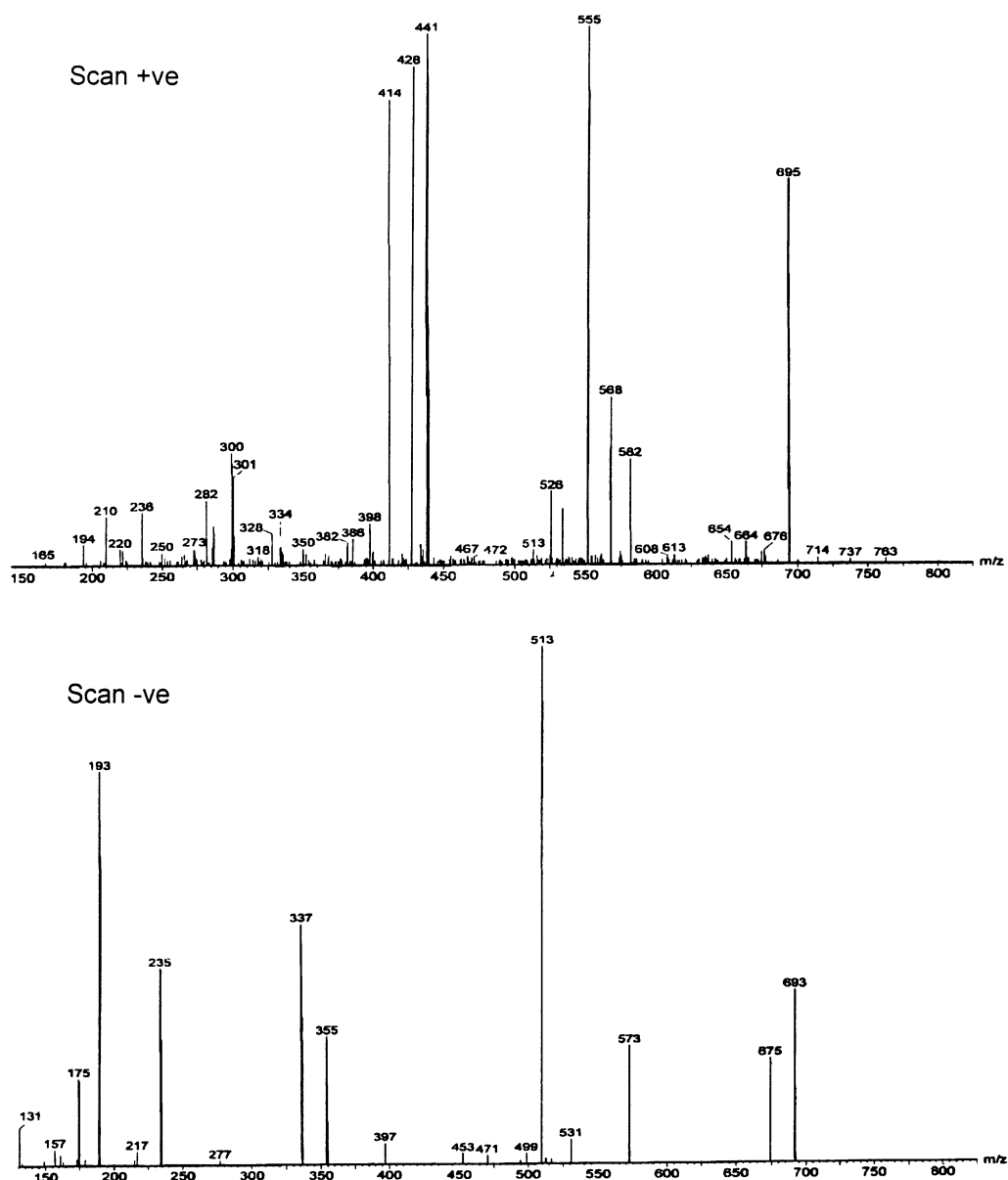


Figura 13: Espectro de electron-spray do oligossacarídeo Oligo-2, mostrando os picos-filhos do fragmento de m/z 695 (scan +ve) e 693 (scan -ve). Realizado no Plant Biotechnology Institute, Nacional Research Council, Saskaton, Sask., Canadá.

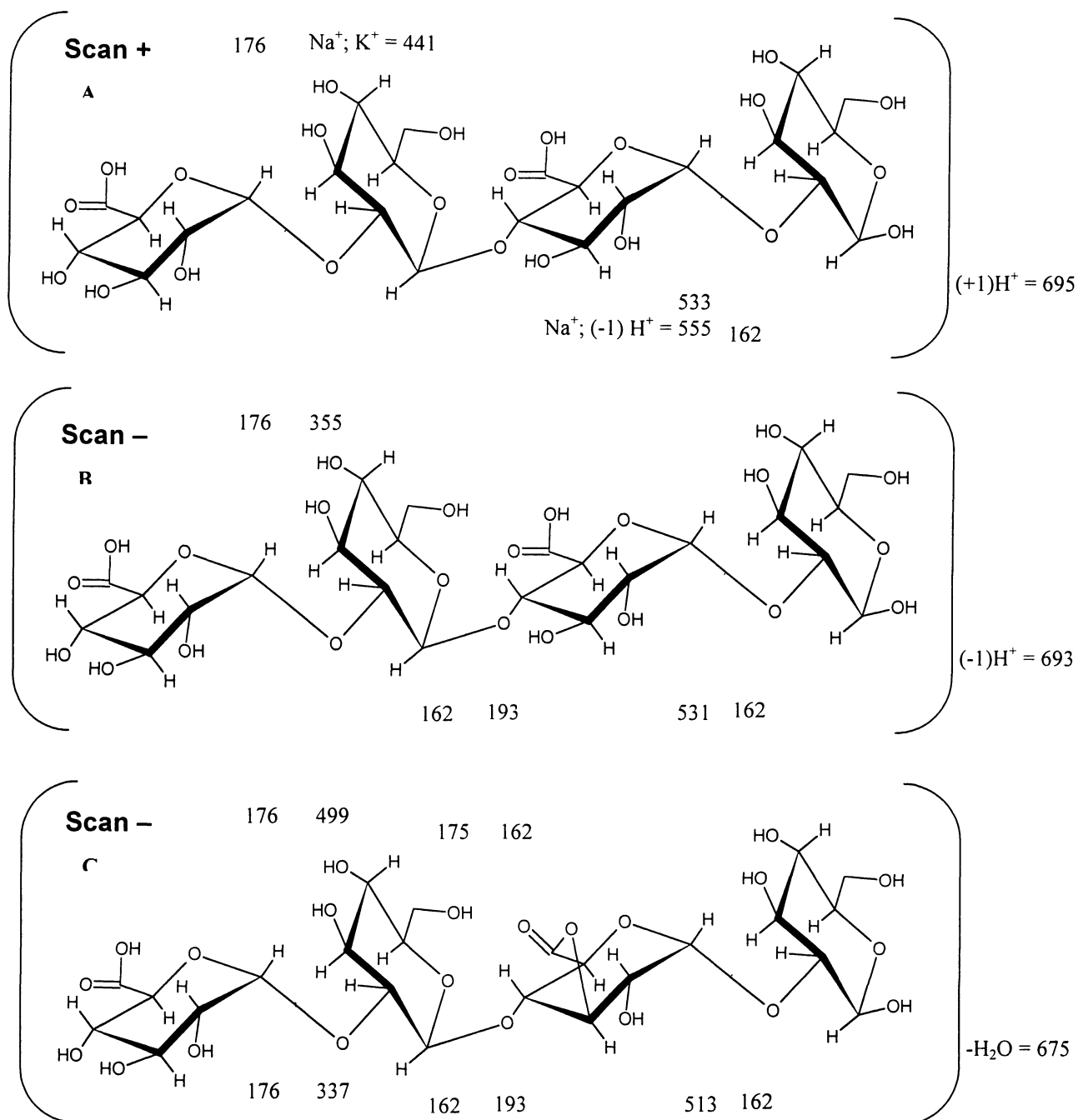


Figura 14: Esquema de fragmentação do tetrassacarídeo Oligo-2, obtido através do bombardeamento do fragmento de relação m/z 694. (A) modo de fragmentação positivo; (B) modo de fragmentação negativo, partindo do fragmento de relação m/z 693; (C) modo de fragmentação negativo, partindo do fragmento de relação m/z 675, onde ocorre a perda de água em uma unidade de ácido glucurônico interna.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

A goma de *Vochysia* sp. (Quaruba) é um exsudato solúvel em água, formando uma solução relativamente não viscosa e a análise realizada por HPSEC-MALLS revelou uma molécula que pode estar formando um agregado, possivelmente pela alta carga apresentada pela molécula. Este agregado está fortemente estabilizado, pois mesmo quando se trata a molécula com solução de uréia 6M, a força iônica desta não é capaz de quebrar as ligações existentes neste polímero.

A composição monossacarídica consta de uma relação molar de Man:GlcA:Ara:Gal:Glc de 30:30:16:10:14. Por meio do ensaio de carboxirredução pode concluir que o ácido urônico presente é o ácido glucurônico, pois quando a redução ocorreu, as unidades de ácido glucurônico foram reduzidas para o seu açúcar neutro correspondente, a glucose. Este dado foi confirmado através da composição monossacarídica do polissacarídeo carboxirreduzido e através do desaparecimento do sinal de C-6 de ácido urônico no RMN.

Este polissacarídeo, aparentemente, é bem simples, visto que através dos dados de metilação os principais derivados metilados encontrados foram os que indicam unidades de manose O-2 substituída e unidades de ácido glucurônico O-4 substituídas. O espectro de ^{13}C -RMN apresenta apenas dois sinais na região de carbono anomérico, C-1. Estes sinais podem ser atribuídos as unidades de α -D-Man $_p$ e β -D-Glc $_p$, que são os deslocamentos químicos de δ 99,3 e 101,5, respectivamente. Com esses dados admitiu-se uma estrutura repetitiva na cadeia principal com unidades de α -D-Man $_p$, O-2 substituída, e β -D-Glc $_p$ A, O-4 substituída, alternadas.

Os oligossacarídeos contendo ácido urônico, produzidos através de hidrólise ácida parcial, foram um aldobiourônico e um tetrassacarídeo com o mesmo motivo repetitivo do dissacarídeo. Pelas análises de metilação e dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC e COSY concluiu-se que o oligossacarídeo Oligo-1 é um dissacarídeo, composto de ácido glucurônico e manose, tendo esta última como unidade redutora e O-2 substituída; β -D-Glc $_p$ A-(1 \rightarrow 2)- α β -D-Man $_p$. O oligossacarídeo Oligo-2 foi caracterizado como um tetrassacarídeo composto de β -D-Glc $_p$ A-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man $_p$ -(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc $_p$ A-(1 \rightarrow 2)- α β -D-Man $_p$. Os dados de metilação não foram

totalmente conclusivos, mas as análises de RMN uni e bidimensionais esclareceram todas as dúvidas. As análises de electro-spray confirmaram o tetrassacarídeo por ter um pico de íon molecular com razão m/z 695 para o modo positivo e m/z 693 para o modo negativo, confirmam a presença e a seqüência das unidades presentes no oligossacarídeo Oligo-2. Desta forma, contribuindo para concluir que os oligossacarídeos obtidos fazem parte da cadeia principal da molécula.

Reunindo os dados obtidos, podemos concluir que esta goma é composta de um polissacarídeo muito simples e com uma cadeia principal repetitiva, onde unidades de manose e ácido glucurônico estão alternadas, formando uma cadeia principal – uma glucuronomanana, embora tenha uma viscosidade muito menor que a goma Ghatti, a qual tem uma estrutura similar de cadeia principal, $-\beta$ -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 4) (ASPINALL, 1982).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, Y.; EDA, S.; MORI, M.; KATO, K.. An arabinoglucuronomannan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured Tobacco cells. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 48 (2), p. 403-407, 1984.

ASPINALL, G.O. Gums and mucilages. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, New York, v. 24, p. 333-379, 1969.

ASPINALL, G.O.. Isolation and fractionation of polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, v. 1, p. 19-26, 145-148, 1982.

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. **Carbohydrate Research**, v. 97, p. 147-150, 1981.

BARTNICKI-GARCIA, S.; LINDBERG, B. Partial characterization of mucoran: the glucuronomannan component. **Carbohydrate Research**, v. 23, p. 75-85, 1972.

BELESKI-CARNEIRO, E.B.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Structural aspects of the exudate from the fruit of *Chorisia speciosa* St. Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 219-224, 1999.

BRADFORD, M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

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

DELGOBO, C.L. **Estudo parcial do polissacarídeo do exsudato de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco)**. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica, UFPR, 1993.

DELGOBO, C.L. **Polissacarídeos e oligossacarídeos no exsudato de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco)**. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, UFPR, 242p., 1999.

DELGOBO, C.L.; GORIN, P.A.J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47(7), p.1207-1214, 1998.

DELL, A.; MORRIS, H.R. Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. **Science**, USA: American Association, v. 291, p. 2351-2356, 23 March, 2001.

DI FABIO, J.L.; DUTTON, G.G.S.. The structure of *Chorisia speciosa* gum. **Carbohydrate Research**, v. 99, p. 41-50, 1982.

DUARTE, J.H.; JONES, J.K.N. Some studies on the galactans from the albumen glands of the snail, *Strophocheilus oblongus*. **Carbohydrate Research**, v. 16 (2), p. 327-335, 1971.

DUBOIS, M.; GILLES, R.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

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

GENTRY, A.H. **A field guide to the families and genera of woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru), with supplementary notes on herbaceous taxa.** Washington, DC: Chicago Press, 1993.

GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharide by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 5, p. 361-369, 1965.

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

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies of the assignment of signals in C-13 magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, p. 1212-1223, 1975.

GOWDA, D.C.; REUTER, G. and SCHAUER, R.. Structural studies of an acidic polysaccharide from the mucin secreted by *Drosera capensis*. **Carbohydrate Research**, v. 113, p. 113-124, 1983.

HESS, S.C. BRUM, R.L.; HONDA, N.K.; CRUZ, A.B.; MORETTO, E.; CRUZ, R.B.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 97-100, 1995.

HOUGH, L.; JONES, J.K.N.. Chromatography. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 21-31, 1962.

ICHIKAWA, T.; NISHIKAWA, A.; HIDEKI, W.; IKEDA, R.; SHINODA, T. Structural studies of the antigen III cell wall polysaccharide of *Trichosporon domesticum*. **Carbohydrate Research**, v. 330, p. 495-503, 2001.

JASEJA, M.; PERLIN, A.S.; DUBINSKY, O.; CHRISTIAEN, D.; GLASER, R. N.M.R. structure determination of 3-O-(α -D-glucofuranosyluronic acid)-L-galactopyranose, an aldobiouronic acid isolated from the unicellular red alga *Rhadella reticulata*. **Carbohydrate Research**, v. 186 (2), p. 313-319, 1989.

JONES, J.K.N.; SMITH, F. Plant gums and mucilages. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 243-283, 1949.

LEÓN DE PINTO, G. Carbon-13 N.M.R.-spectral study of *Acacia xanthophloea* gum and its degradation products. **Carbohydrate Research**, v. 220, p. 229-242, 1991.

LEÓN DE PINTO, G.; GOTERA, O. G.; MARTÍNEZ, M.; OCANDO, E.; RIVAS, C. The molecular characterization of polysaccharide gum from *Laguncularia racemosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 205-213, 1997.

LORENZI, H.. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2^a ed., v. 1 e 2. Nova Odessa : Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998.

MENESTRINA, J.M. **Estrutura química do polissacarídeo e dos oligossacarídeos livres do exsudato de *Anacardium occidentale* L. (Cajueiro)**. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, UFPR, 239 p. 1999.

MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P.A.J.. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47 (5), p. 715-721, 1998.

MORI, M. and KATÓ, K.. An arabinoglucuronomannan from suspension-cultured cells of *Nicotiana tabacum*. **Carbohydrate Research**, v. 91, p. 49-58, 1981.

OGAWA, K.; IKEDA, Y.; KONDO, S. A new trisaccharide, α -D-glucopyranuronosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranose from *Chlorella vulgaris*. **Carbohydrate Research**, v. 321, p. 128-131, 1999.

OGAWA, K.; YAMAURA, Y.; IKEDA, Y.; KONDO, S.. New aldobiuronic acid, 3-O- α -D-glucopyranuronosyl-L-rhamnopyranose from an acidic polysaccharide of *Chlorella vulgaris*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62 (10), p. 2030-2031, 1998.

RUDD, P. M.; ELLIOTT, T.; CRESSWELL, P.; WILSON, I. A.; DWEK, R.A. Glycosylation and the immune system. **Science**, USA: American Association, v. 291, p. 2370-2376; 23 March, 2001.

RUSSEL, J. B. **Química geral**. São Paulo: McGraw-Hill, 1981.

SCOTT, J. E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 38-44, 1965.

STEPHEN, A. M.. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. **The polysaccharides**. London: Academic Press, v. 2, p. 97-180, 1983.

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

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4^a ed., 1996.

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

TISCHER, C.A.; IACOMINI, M.; WAGNER, R.; GORIN, P.A.J.. New structural of the polysaccharide from gum ghatti (*Anogeissus latifolia*). **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2205-2210, 2002.

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

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A.. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York, v. 2, p. 211-215, 1963(a).

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A.. Reduction with borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York, v. 2, p.65-67, 1963(b).

SITES CONSULTADOS.

Jornal Atuante, Cotia – SP. Disponível em:
<<http://www.cotianet.com.br/jornalatuante/mat072.htm>> Acesso em 10 de abril de 2002.