

ALEXANDER DMYTRACZENKO

DISTRIBUIÇÃO DE HEXOSAMINAS EM VÁRIOS
ORGÃOS DE **BIOMPHALARIA GLABRATA**

Tese de mestrado em Bioquímica
apresentada ao Instituto de Bio-
química da Universidade Federal
do Paraná.

CURITIBA
1969

ALEXANDER DMYTRACZENKO

DISTRIBUIÇÃO DE HEXOSAMINAS EM VÁRIOS ÓRGÃOS DE
BIOMPHALARIA GLABRATA

Tese de mestrado em Bioquímica
apresentada ao Instituto de Bio-
química da Universidade Federal
do Paraná.

CURITIBA
-1969-

INTRODUÇÃO

Biomphalaria glabrata é hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni e seu habitat preferido no Brasil se localiza em zonas sujeitas a sêcas periódicas. Nestas ocasiões, como também quando em jejum, o caramujo lança mão de suas reservas nutritivas para sobreviver.

Brand, McMahon e Nolan (1957), demonstraram que espécimes de Biomphalaria glabrata, quando submetidos a jejum e dessecação, têm o teor de polissacarídeos diminuído progressivamente. Tal decréscimo não é uniforme em todos os órgãos do caramujo, sendo pequeno no pé e muito acentuado na glândula digestiva e ovotestis (Magalhães Neto e Almeida, 1956). Entretanto, os autores acima citados não estudaram as alterações metabólicas de glicosaminoglicanos. Em 1963, Dmytraczenko, Gleich, Duarte e Bacila determinaram a concentração de carboidratos neutros em hidrolisados ácidos de partes moles totais de Biomphalaria glabrata, tendo sido eliminados previamente os amino açúcares.

Duarte, Fokama, Corrêa e Bacila (1964), isolaram dois polissacarídeos ácidos por precipitação com cetavlon. Estes pesquisadores haviam eliminado o glicosaminoglicano por extração com hidrato de cloral. Motta, Duarte, Cardoso e Bacila (1964), estudando a hemolinfa do caramujo não encontraram hexaminas livres entre os carboidratos livres isolados. Entretanto, Dmytraczenko, Duarte e Bacila (1964) demonstraram que hidrolisados ácidos de partes moles totais de Biomphalaria glabrata contém 1,34% de hexosaminas em base seca.

Apesar de numerosas investigações no campo da bioquímica de carboidratos em Biomphalaria glabrata torna-se necessário um estudo detalhado sobre a distribuição e composição de glicosaminoglicanos, como um requisito importante para futuras investigações visando esclarecer as alterações metabólicas de glicosaminoglicano neste caramujo.

No intuito de esclarecer a distribuição destas macromoléculas em tecidos de Biomphalaria glabrata, foram estudadas, neste trabalho, as distribuições quantitativas de hexosaminas nos principais órgãos e glândulas do caramujo. A

origem química destas hexosaminas merece um estudo em separado com a finalidade de determinar a composição e estrutura química dos compostos ricos em amino açúcares.

O termo glicosaminoglicano é usado no presente trabalho para polissacarídeos que contêm aminoaçúcares, de acordo com a nomenclatura proposta por Jeanloz (1960), e o termo hexosaminas significa 2-amino-deoxiaçúcares de acordo com Foster e Stacey (1952).

Segundo a proposição 735 da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (Bull. Zool. Nomencl. 1965) utilizamos o nome genérico Biomphalaria glabrata como sinônimo principal de Australorbis.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes de Biomphalaria glabrata, com um diâmetro máximo de concha de 15 mm, foram coletados de diversos pontos nos arredores de Curitiba, Paraná.

Após 24 horas de observação foram separados os caramujos que não eliminavam cercárias e submetidos a jejum por 48 horas. Após o que, os caramujos foram mortos por imersão em água quente (70 a 75°C) por 60 segundos e seus corpos retirados das conchas. Sómente caramujos que não eram portadores de parasitas foram subsequentemente utilizados. De todos os caramujos foi retirado o aparelho digestivo. As partes restantes dos corpos, obtidos por êsse procedimento, foram denominados de "partes moles totais". Por dissecação foram obtidas glândulas de albúmem, glândula digestiva, ovotestis, pés, massa cefalopedal e as "partes restantes" da remoção dos órgãos citados.

As amostras a serem investigadas foram homogenizadas em um homogenizador de van-Potter-Elvehjem. Aliquotas de cada extrato foram retiradas para determinação de pêso sêco. As determinações de pêso sêco foram efetuadas em cadinho de porcelana a 105°C até pêso constante. Os homogenizados foram submetidos à hidrólise ácida e o tempo ótimo de hidrólise estabelecido com HCl 6N, sob atmosfera inerte de nitrogênio, em tubos de vidro selados e a 100°C. O excesso de HCl foi removido em evaporador a vácuo a 36-40°C e as hexosaminas determinadas pelo método de Elson-Morgan modificado por Boas (1953). Também foram efetuadas determinações de hexosaminas antes da hidrólise ácida. Soluções padrão de N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, D-glucosamina e D-galactosamina foram submetidos ao mesmo tratamento. Procedeu-se a separação das hexosaminas e N-acetil-hexosaminas por passagem através de coluna de resina trocadora de ions Dowex 50W-X8, 200 a 400 mesh, seguindo o método de purificação sugerido por Boas (1953), as acetil-hexosaminas foram eluídas com água e as hexosaminas com HCl 2N. A determinação quantitativa das acetil-hexosaminas foi realizada pela reação de Elson-Morgan modificada por Aminoff, Morgan e Watkins (1952). A fração correspondente às hexosaminas foi cromatografada em papel Whatman nº 1 e o cromatograma desenvolvido de maneira descendente usando o seguinte sistema de solvente: piridina - acetato de etila - água —

ácido acético glacial, 5:5:3:1 partes por volume (Fisher, Nebel, 1955). Os cromatogramas foram revelados com o reagente de Elson-Morgan (Smith, 1960). As hexosaminas foram separadas quantitativamente em coluna de 9 x 400 mm, com resina de ions Dowex 50W-X8, 200 a 400 mesh, de acôrdo com a técnica de Gardell (1953) e o volume necessário para eluir os amino açúcares foi expresso em têrmos de "valor de R-glucosamina" de Crumpton (1958). Êste valor corresponde ao quociente do volume necessário para eluir a concentração máxima em uma fração (peak-volume) de um amino açúcar pelo volume necessário para a glucosamina.

Após separadas, as hexosaminas foram submetidas à degradação com ninhidrina (Stoffyn e Jeanloz, 1954) e as pentoses obtidas foram cromatografadas em papel Whatman nº 1, sendo o cromatograma desenvolvido com 1-butanol, etanol, água, 4:1:1 partes por volume. A visualização das pentoses foi realizada com nitrato de prata alcalino (Trevelyan, Procter e Harrison, 1950). Foi feita, também, eletroforese das amostras, bem como de padrões de hexosaminas em borato de sódio a 1%, utilizando-se 17,6 Volts/cm por 3 horas a 18°C (Maley e Maley, 1959).

Uma aliquota do homogenado de partes moles totais foi também hidrolisado com H₂SO₄ 1N, por 3 horas, numa proporção de 10 mg/2ml e neutralizada com Ba(OH)₂. O precipitado de BaSO₄ foi eliminado por centrifugação e o sobrenadante desionizado com resinas trocadoras de ions Dowex 50W-X8, 200 a 400 mesh, forma H⁺ e Amberlite IR-4B, forma OH⁻. A solução desionizada foi concentrada em evaporador a vácuo a 35-40°C e os carboidratos neutros determinados pelo método da titulação iodométrica (Somogyi, 1952). Para as determinações espectrofotométricas utilizou-se um espectrofotômetro Beckman, modelo DU.

RESULTADOS

A hidrólise ácida de homogenados de Biomphalaria glabrata mostrou que em 3 horas de hidrólise obtém-se um rendimento máximo em hexosaminas, havendo uma destruição parcial após êste período (figura 1).

O espectro de absorção do produto da reação de Elson-Morgan com o hidrolisado do homogenado das "partes moles totais" nos comprimentos de onda compreendidos entre 400 e 600 m μ , mostrou apenas um máximo de absorção em 530 m μ , característico do cromógeno formado na reação de Elson-Morgan (figura 2), demonstrando que as impurezas interferentes foram tôdas prèviamente eliminadas.

As dosagens de carboidratos nos hidrolisados mostraram que as partes moles totais contêm 11,75 g de carboidratos neutros e 1,34 g de hexosaminas por 100 g de pêsco sêco respectivamente. No material não hidrolisado das partes moles totais, não foram encontradas hexosaminas livres. Os padrões de N-acetil-D-hexosaminas submetidos à hidrólise ácida foram recuperados na forma de hexosaminas. Desta forma todos os amino açúcares determinados são dados em têrmos de base livre e expressos em g% de pêsco sêco. Os resultados analíticos da distribuição de hexosaminas em órgãos e tecidos de Biomphalaria glabrata são mostrados na tabela 1. A concentração máxima de hexosaminas (1,67 g%) foi observada no pé dos moluscos e a mínima (0,35 g%) no ovotestis.

Como pode ser observado no cromatograma da figura 3, o hidrolisado de partes moles totais apresenta duas manchas, correspondentes à D-glucosamina e D-galactosamina. A separação quantitativa dêstes aminoaçúcares em coluna de resina trocadora de ions, mostrou duas frações distintas A e B (figura 4) tanto nas partes moles totais como também nos demais órgãos e tecidos estudados.

A degradação das frações A e B pela ninhidrina (figura 5) mostra como resultado arabinose e lixose respectivamente.

Na figura 4 pode-se observar que a fração A mostra a concentração máxima eluída com 146 ml e a fração B com 174 ml, o que fornece um valor

R-glucosamina igual a 1,19. Este valor está de acordo com dados experimentais para D-galactosamina/D-glucosamina.

A percentagem individual para cada aminaçúcar, bem como a razão glucosamina/galactosamina também foram determinados e estão expressos na tabela 1. O pé e a massa cefalopedal mostram as relações glucosamina/galactosamina mais baixas, enquanto os outros órgãos as têm insensivelmente mais altas.

Tôdas as amostras se comportaram eletroforêticamente de maneira idêntica aos padrões de D-glucosamina e D-galactosamina.

TABELA 1 - Concentração e distribuição de hexosaminas em vários órgãos de Biomphalaria glabrata.

Órgãos	Hexosaminas totais g% ⁺	Glucosamina g% ⁺	Galactosamina g% ⁺	Quociente glucosamina/galactosamina
Pé	1,67	0,53	1,14	0,47
Glândula Digestiva	1,29	0,30	0,49	1,63
Glândula de albúmem	1,15	0,68	0,47	1,44
Massa cefalopedal	1,15	0,48	0,67	0,71
Ovotestis	0,35	0,22	0,13	1,69
Partes restantes	0,94	0,53	0,31	1,71
Partes moles ++ totais	1,34	0,75	0,58	1,33

+ = Os resultados são expressos em g% de peso seco.

++ = Após retirado o aparelho digestivo.

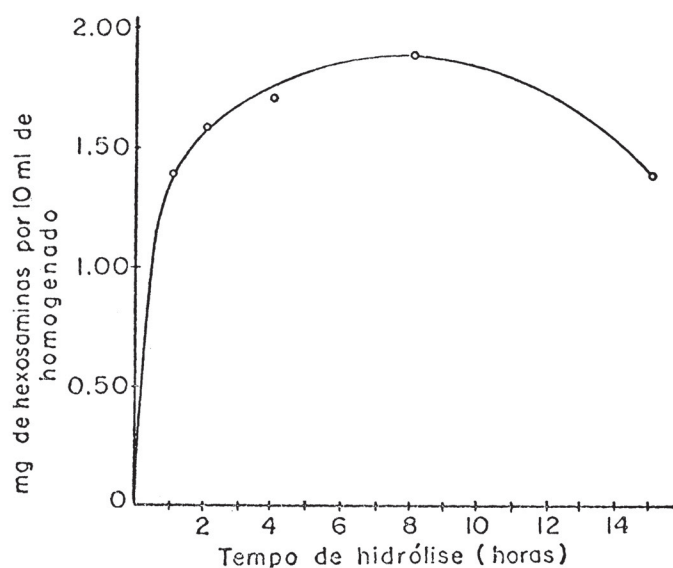


Fig. 1 - Curva de hidrólise, com HCl 6N, a 100°C, de homogenados das partes moles totais de Biomphalaria glabrata após remoção do aparelho digestivo.

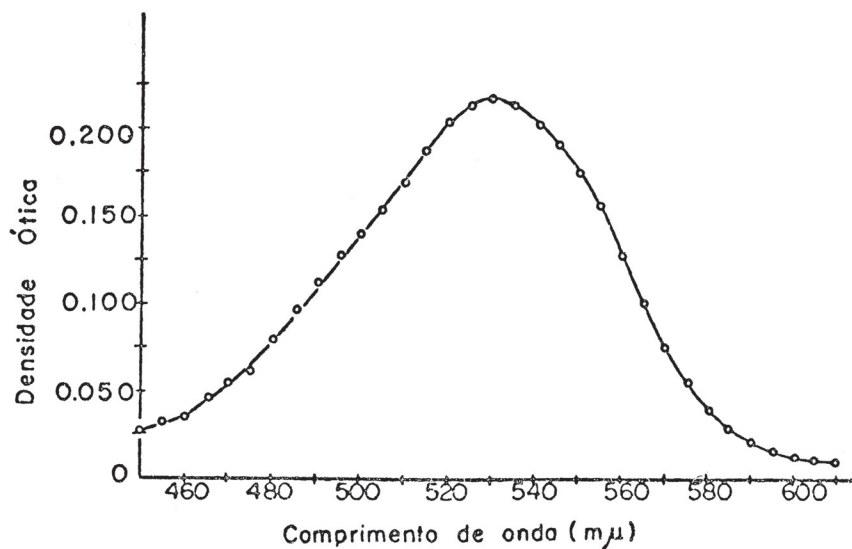


Fig. 2 - Espectro de absorção do produto da reação de Elson-Morgan para determinação de hexosaminas, usando hidrolisados de partes moles totais purificados de Biomphalaria glabrata.

1 2 3

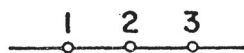


Fig. 3 - Separação de hexosaminas obtidas de hidrolisados purificados das partes moles totais por cromatografia descendente em papel.

1. Padrão de D(+)-galactosamina · HCl

2. Amostra

3. Padrão de D(+)-glucosamina · HCl

Sistema solvente: piridina - acetato de etila-H₂O-ácido acético (5:5:3:1)

Revelador: Reativo de Elson-Morgan

Tempo de desenvolvimento: 70 horas

Papel Whatman nº 1

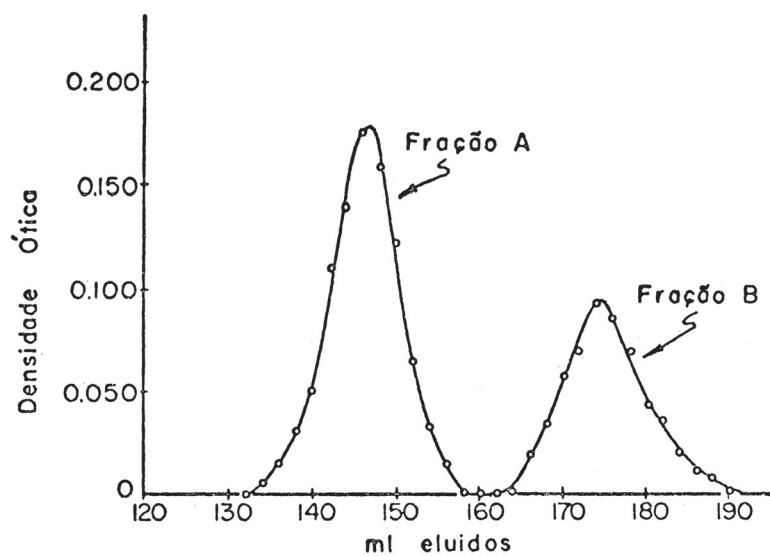


Fig. 4 - Separação quantitativa de hexosaminas obtidas de partes moles totais, em coluna de resina trocadora de ions Dowex 50W-X8, 200 a 400 mesh, utilizando HCL 0,3N como eluente. As hexosaminas foram determinadas pela reação de Elson-Morgan em frações de 0,5 ml de eluente.

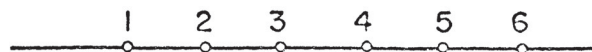


Fig. 5 - Cromatografia descendente em papel das frações A e B (fig. 4) degradadas com ninhidrina.

1. Padrão de D(+)-galactosamina-HCl, degradado com ninhidrina
2. Padrão de lixose
3. Fração B degradada com ninhidrina
4. Padrão de arabinose
5. Fração A degradada com ninhidrina
6. Padrão de D(+)-glucosamina-HCl, degradado com ninhidrina

Sistema solvente: n-butanol-etanol-H₂O (4:1:1)

Revelador: Nitrato de prata alcalino

Tempo de desenvolvimento: 24 horas

Papel: Whatman nº 4.

DISCUSSÃO

Vários métodos histoquímicos são conhecidos para a determinação de glicosaminoglicanos em tecidos, estes entretanto não distinguem quantitativamente os vários componentes destas macromoléculas. O primeiro a conseguir separações quantitativas, em microescala, de glicosaminoglicanos em tecidos foi Antonopoulos e col. (1964). Como em nosso caso tratava-se de estudar a distribuição de aminoaçúcares de todos os compostos que contêm hexosaminas, preferimos determinar os aminoaçúcares diretamente nos hidrolisados ácidos purificados.

Quando se determina quantitativamente o conteúdo de hexosaminas em tecidos hidrolisados, várias dificuldades surgem, não somente pelo catalisador (H^+) em si, mas também outras provenientes da interreação entre aminoácidos e açúcares conforme a reação de Maillard (Gottschalk, 1966). Entretanto, existem procedimentos pelos quais se consegue contornar dificuldades encontradas na determinação de hexosaminas em hidrolisados ácidos. Durante a hidrólise ácida de um polissacarídeo contendo N-acetilhexosaminas, o grupamento N-acetil é cindido e forma-se como que um escudo eletrostático no grupo $-NH_3^+$ que torna a ligação glicosídica resistente à hidrólise ácida por repulsão dos ions H^+ (Stacey e Barker, 1960). Johansen, Marshall e Neuberger (1960) assinalaram que a velocidade de hidrólise de ligações glicosídicas cresce com o aumento da temperatura e da concentração do ácido. Havendo durante a hidrólise altas concentrações de ácido mineral, ocorre destruição de hexosaminas, especialmente galactosamina, e um fator experimental de correção deve ser introduzido (Graham e Gottschalk, 1960). Por essas razões, condições ótimas de hidrólise devem ser determinadas para cada tecido e os valores máximos obtidos devem ser considerados como aproximações dos valores reais (Gottschalk, 1963). Considerando esses fatos, submetemos padrões de D-glucosamina e D-galactosamina às nossas condições ótimas de hidrólise e observamos que não houve destruição que exigisse a introdução de um fator de correção. Quando se hidrolisou a mistura de aminoaçúcares e proteínas, 93,6% dos aminoaçúcares foram recuperados do hidrolisado. Desta forma resultados experimentais mostraram-se reprodutíveis e precisos até para frações contendo de 10 a 15 μg de hexosaminas.

Gardell, Heijbonskjold e Rochnorlund (1950), trataram isoladamente hexosaminas com ninhidrina, convertendo glucosamina em arabinose e galactosamina em lioxose. De maneira similar, a conversão das frações A e B em pentoses, por degradação com ninhidrina (figura 5) mostrou a presença de arabinose e lioxose respectivamente. A obtenção destas pentoses confirma arranjos iguais aos da glicose e galactose nos carbonos 3, 4, 5 e 6 das moléculas das hexosaminas (Kent e Whitehouse, 1955). Esta experiência também demonstra que o grupo amino está no carbono 2; entretanto, não fornece nenhuma informação quanto à configuração do grupo amino no carbono 2 e sugere duas possibilidades estruturais para cada fração isolada. Desta forma a arabinose obtida a partir da fração A tanto pode provir de glucosamina quanto da manosamina e a lioxose resultante da fração B pode ter a sua origem na galactosamina ou na talosamina.

Crompton (1958) demonstrou que quando um amino açúcar é eluído de uma coluna de resina trocadora de ions Zeo-Karb 225, utilizando-se HCl 0,33N, conserva uma razão constante entre o "peak-volume" necessário para eluir um amino açúcar e o "peak-volume" necessário para eluir a glucosamina da mesma coluna. Esta razão, chamada de valor R-glucosamina, é independente do comprimento da coluna, da quantidade da resina e da normalidade do ácido utilizado como eluente dentro de uma faixa compreendida entre 0,25 a 0,50N. Utilizando procedimento similar a razão entre a fração B e a fração A nos forneceram um valor R-glucosamina de 1,19; sendo que este valor é idêntico ao obtido experimentalmente com glucosamina e galactosamina e que está de acordo com os dados de Crompton (1958). Como a talosamina possui um valor R-glucosamina igual a 1,60 foi excluída a possibilidade da presença deste epímero da galactosamina. As frações A e B também mostraram migrações ionoforéticas idênticas aos padrões de glucosamina e galactosamina, excluindo a manosamina. Pode-se concluir que os aminoaçúcares isolados de Biomphalaria glabrata são glucosamina e galactosamina.

A alta concentração de hexosaminas no pé do caramujo pode ser relacionada com a presença de uma glândula constituída fundamentalmente de células mucosas contendo grânulos basófilos fortemente PAS-positivos que entretanto não apresentam metacromasia com fionina ou azul de toluidina, indicativa de mucopolissacarídeos (Pan, 1958). Gottschalk (1963) demonstrou que os principais constituintes orgânicos das secreções mucosas são glicoproteínas e que estas

são as responsáveis pelas propriedades físicas destas secreções. O teor de amino açúcares é uma das principais características destas proteínas ricas em carboidratos. Como o pé não contém glucosamina-glucuronoglicano e considerando a afirmação de Gottschalk, a presença de glicoproteínas pode explicar o alto teor de hexosaminas neste órgão de Biomphalaria glabrata. Como o caminho metabólico de aminoaçúcares neste caramujo é desconhecido, torna-se difícil de explicar a baixa razão glucosamina/galactosamina observada no pé, em contraste com as demais partes estudadas.

Dorfman, Markovitz e Cifonelli (1953) e Glaser e Brown (1957), demonstraram que na incorporação de hexosaminas em polissacarídeos intermediário desta incorporação é UDP-hexosamina. Shetlar e colaboradores (1961) também demonstraram a incorporação de glucosamina, com carbono marcado em posição 1, em glicoproteínas sanguíneas. Um outro dado importante a ser ressaltado é a epimerização de glucosamina em galactosamina que também se faz por intermédio de nucleotídeoaçúcar e ocorre em tecidos e microrganismos, demonstrada por Cardini e Leloir (1957), Maley e Maley (1959), Glaser (1959) e Jacobson e Davidson (1963). Estas observações sugerem a possibilidade de uma epimerização no carbono 4 como explicação pela alta concentração de galactosamina no pé do caramujo. Nos demais órgãos estudados individualmente, ou seja, glândula de albúmen, glândula digestiva, ovotestis e massa cefalopedal não está claro se as hexosaminas fazem parte da fração de carboidratos de glicoproteínas ou de glicosaminoglicanos, mas nas "partes restantes" há evidência em favor da última hipótese. Pan (1953) demonstrou que o oviduto e a glândula nidamental, ambos fazendo parte das "partes restantes" do presente trabalho, contém dois glicosamino-glucuronoglicanos, o que está de acordo com resultados obtidos por Duarte e colaboradores (1954), que isolaram duas frações de polissacarídeos ácidos das partes moles totais de Biomphalaria glabrata, utilizando métodos que envolviam precipitações com catavlon.

Os dados atuais não permitem maiores conclusões sobre a natureza química dos polímeros ricos em glucosamina e galactosamina presentes nos diferentes órgãos e tecidos estudados, sendo que para tanto tornam-se necessários estudos mais detalhados.

CONCLUSÕES

- 1 - Foi constatada a presença de glucosamina e galactosamina nos órgãos e tecidos estudados.
- 2 - As partes moles totais apresentaram 1,34 g% de hexosaminas totais em peso seco.
- 3 - A concentração máxima de hexosaminas totais foi observada no pé (1,67 g%) e a concentração mínima no ovotestis (0,35 g%).
- 4 - O cóo e a massa cefalopodal apresentam o quociente glucosamina/galactosamina menor que a unidade, enquanto que os demais órgãos tem o quociente maior que a unidade.

BIBLIOGRAFIA

- AMINOFF, D., MORGAN, W.T.J. and WATKINS, W.M., 1952, Studies in immunochemistry. II. The action of dilute alkali on the N-acetylhexosamines and the specific blood-group mucoids. *Biochem. J.*, 51: 379-389.
- ANTONOPOULOS, C.A., GARDELL, S., SZIRMAI, J.A. and DE TYSSONSK, E.R., 1964, Determination of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from tissues on the microgram scale. *Biochim. Biophys. Acta*, 33: 1-19.
- BOAS, N.F., 1953, Methods for the determination of hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.*, 204: 553-563.
- BRAND, T. von, McMAHON, P. and NOLAN, M.O., 1957, Physiological observations on starvation and desiccation of the snail *Australorbis glabratus*. *Biol. Bull.*, 113: 89-102.
- BULLETIN of Zoological Nomenclature, 1965, 22(2): 94-99.
- CARDINI, C.E. and LELOIR, L.F., 1957, Enzymatic formation of acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.*, 226: 317-324.
- CRUMPTON, M.J., 1959, Identification of amino sugars. *Biochem. J.*, 69: 25 p.
- DAMYTRACZENKO, A., DUARTE, J.H. e BACILA, M., 1964, Hexosaminas em *Australorbis glabratus*. *Ciência e Cultura*, 16: 190.
- DAMYTRACZENKO, A., GLEICH, M.M., DUARTE, J.H. e BACILA, M., 1963, Estudo dos carboidratos neutros de *Australorbis glabratus*. *Ciência e Cultura*, 15: 266.
- DORFMAN, A., MARKOVITZ, A. and CIFONELLI, J.A., 1958, Metabolism of

- hyaluronic acid and chondroitinsulfuric acid. *Federation Proc.*, 17: 1093-1099.
- DUARTE, J.H., FOKAMA, G., CORRÊA, J.B.C. e BACILA, M., 1964, Isolamento de polissacarídeos de *Australorbis glabratus*. *Ciência e Cultura*, 14: 139-193.
- FISHER, F.G. and NEBEL, H.J., 1955, *Z. Physiol. Chem.*, 302: 19, citado por Gardell, S., 1953, Determination of hexosamines, In: D. Glick, Ed., *Methods of biochemical analysis*, Vol. 6, Interscience Publishers, New York, p. 239-317.
- FOSTER, A.B. and STACEY, M., 1952, The chemistry of the 2-amino sugars (2-amino-2-deoxy-sugars). In: Ed., C.S. Hudson, M.L. Wolfrom and S. M. Castor. *Advances in carbohydrate chemistry*, Vol. 7, Academic Press, New York, p. 247-288.
- GARDELL, S., 1953, Separation on Dowex 50 ion exchange resin of glucosamine and galactosamine and their quantitative determination. *Acta Chem. Scand.*, 7: 207-215.
- GARDELL, S., HEIKENSKJOLD, F. and ROCHNORLUND, A., 1950, Oxidation of glucosamine and galactosamine with ninhydrine to arabinose and lyxose and their identification by paper chromatography. *Acta Chem. Scand.*, 4: 970.
- GLASER, L., 1959, The biosynthesis of N-acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.*, 234: 2301-2305.
- GLASER, L. and BROWN, D.H., 1957, The synthesis of chitin in cell-free-extracts of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 223: 729-742.
- GOTTSCHALK, A., 1963, The basic structure of glycoproteins and problems of their chemical and physicochemical analysis. *Ann. New York Acad. Sci.*, 106: 163-173.

- GOTTSCHALK, A., 1956, Interaction between reducing sugar and amino acids under neutral and acid conditions. In, A. Gottschalk, Ed., Glycoproteins, their composition, structure and function, BB_A Library, Vol. 5, Elsevier Publishing, Company, Amsterdam. p. 96-111.
- GRAHAM, E.R.D. and GOTTSCHALK, A., 1960, Studies on mucoproteins. 1. The structure of the prosthetic group of ovine submaxillary gland mucoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 33: 513-524.
- JACOBSON, B. and DAVIDSON, E.A., 1963, UDP-glucuronic acid 5-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase of rabbit skin. *Biochim. Biophys. Acta*, 73: 145-151.
- JEANLOZ, R.W., 1963, Mucopolysaccharides (Acidic glycosaminoglycans). In, Florkin, M. and Statz, E.H., Ed., *Comprehensive biochemistry*, Vol. 5, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, p. 262-296.
- JOHANSEN, P.G., MARSHALL, R.D. and NEUBERGER, A., 1960, Carbohydrates in protein. 2. The hexose, hexosamine, acetyl and amide-nitrogen content of hen's-egg albumin. *Biochem. J.*, 77: 239-247.
- KENT, D.W. and WHITEHOUSE, M.W., 1955, *Biochemistry of the aminosugars*. Butterworth's Scient. Public., London, 137 p.
- MAGALHÃES NETO, B. e ALMEIDA, A.M., 1966, Influência da dessecação sobre o teor de glicogênio dos tecidos em *Australorbis glabratus*. *Pub. av. Inst. Aggeu Magalhães*, 5: 1-5.
- MALEY, F. and MALEY, G.F., 1959, The enzymic conversion of glucosamine to galactosamine. *Biochim. Biophys. Acta*, 31: 577-578.
- MOTTA, E.S., DUARTE, J.H., CARDOSO, T.J.T. e BACILA, A., 1964, Estudo sobre carboidratos de hemolinfa de *Australorbis glabratus*. *Ciência e Cultura*, 16: 190.

- PAN, C., 1933, The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. *Bull. Museum Comp. Zool.*, 119: 237-299.
- SHETLAR, M.R., HERN, D., BRADFORD, R.H. and ENDECOFT, B., 1961, Incorporation of $1-^{14}\text{C}$ glucosamine into serum proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 53: 315-316.
- SMITH, I., 1950, Sugars and related compounds. In: I. Smith, Ed., *Chromatographic and electroforetic techniques*, Vol. 1. William Heinemann, Medical Books. Ltd., London, p. 245-260.
- SOMOGYI, M., 1952, Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195: 19-23.
- STACEY, M. and BARKER, S.A., 1946, *Polysaccharides of microorganisms*. Clarendon Press, Oxford, p. 39-59.
- STOFFYN, P.J. and JEANLOZ, R.W., 1954, Studies on hyaluronic acid and related substances. XII. Identification of amino sugars by paper chromatography. *Arch. Biochim. Biophys.*, 52: 373-379.
- TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. and HARRISON, J.S., 1950, Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166: 444-445.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece aos componentes do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e da Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas pela valiosa colaboração prestada. Em particular, à Dra. Terezinha de T. J. Cardoso, sem cuja inestimável colaboração este trabalho não teria sido possível.

Os agradecimentos são extensivos ao National Institute of Health dos E.U.A. ("grants" nº AI 06074) que propiciou o suporte financeiro necessário à realização do presente trabalho.

Agradece, ainda, o autor, em especial ao Dr. José Hazencleve Duarte, pela orientação da presente tese.