

EFREN ANTONIO DIAZ SEGURA

ESTUDO DE METILAÇÃO EM GALACTANO DE  
**STROPHOCHEILUS OBLONGUS**, APÓS  
DEGRADAÇÃO DE SMITH CONTROLADA

CURITIBA  
1972

EFREN ANTONIO DIAZ SEGURA

ESTUDO DE METILAÇÃO EM GALACTANO DE  
STROPHOCHEILUS OBLONGUS, APÓS DEGRA-  
DAÇÃO DE SMITH CONTROLADA.

Tese apresentada ao Instituto  
de Bioquímica da Universidade  
Federal do Paraná para a ob-  
tenção do título de  
"Mestre em Bioquímica"

Curitiba

1972

"It is hoped that methylation of the original galactogen and of the degraded polysaccharides, and examination of the cleavage products by the newer chromatographic techniques will provide the evidence necessary to decide the fine structure of snail galactogen".

P. O' Colla, Proc. R.I.A., 55, Sect. B. 1952

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Hazencleve Duarte pela orientação e apoio no desenvolvimento desta tese.

Ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, e seus professores pela colaboração e amizade recebida.

À Coordenação dos cursos de Pós-graduação em Bioquímica, na pessoa da Dra. Glaci Zancan, e à Universidade Federal do Paraná, pela valiosa colaboração recebida.

Ao Professor J. K. N. Jones, da Queen's University, Ontario-Canadá, pelas sugestões dadas para o plano de trabalho desta tese.

Ao Dr. Alexander Dmytraczenko, pela realização da electroforese de Tiselius e as sugestões recebidas.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pelo seu alto espírito de companheirismo e amizade.

Ao Instituto Colombiano de Crédito Educativo y Estudios Tecnicos en el Exterior ( ICETEX ), pela ajuda financeira.

À Organização dos Estados Americanos ( OEA ), pela bolsa de estudos durante o ano de 1972.

À Universidad del Tolima, pelo apoio e estímulo recebido.

À todas aquelas pessoas e entidades que direta ou indiretamente colaboraram na realização desta tese.

## RESUMO

O galactano extraído da glândula de albumen de *Strophocheilus oblongus* foi submetido a degradação de Smith controlada, e após três tratamentos, o polissacarídeo degradado foi isolado com uma recuperação de 4%.

Os resultados da metilação da primeira e segunda degradações, mostraram um aumento acumulativo do 2,4,6-tri-0-metil-D-galactose, um decréscimo de 2,3,4,6-tetra- e 2,4-di-(quantidades equimoleculares) e uma grande variação na quantidade de 2,3,4, tri-0-metil-D-galactose.

A grande variação deste último derivado, observada durante as degradações é devida ao fato de que os resíduos que originam o 2,3,4-tri-0-metil-D-galactose em uma degradação são destruídos na subsequente. Essa observação, aliada ao fato de eliminação de grupos terminais não redutores, indica que a molécula é degradada a partir dos grupos terminais e de alguns resíduos internos.

Por outro lado, o isolamento de glicosídeos de baixo peso molecular, indica que a molécula é sequencialmente degradada a partir das regiões mais externas.

Considerando esse mecanismo de degradação e os resultados de metilação e oxidação pelo periodato, foi possível sugerir uma estrutura parcial para o galactano de *Strophocheilus oblongus*.

## RESUMEN

El galactano, extraído de la glándula de albumen de *Strophocheilus oblongus*, fué sometido a tres degradaciones de Smith controladas, despues de las cuales se obtuvo un polisacárido degradado que representava el 4% del material original.

Los resultados de metilación de los polisacáridos resultantes de la primera y segunda degradaciones, mostraron un aumento acumulativo del derivado 2,4,6-tri-O-metil-D-galactosa, en cuanto que los derivados 2,3,4,6-tetra- e 2,4-di-O-metil-D-galactosa ( cantidades equimoleculares) sufrieron una disminución acentuada. Tambien fueron observadas variaciones en las cantidades del derivado 2,3,4-tri-O-metil-D-galactosa durante los procesos degradativos, lo cual resulta del hecho de que los residuos que les dan origen son eliminados durante una degradación con la formación de otros iguales en el polímero resultante.

Estas observaciones y la eliminación de grupos terminales no reductores indican que la molécula del galactano sufre degradación tanto en sus grupos terminales como en algunos residuos internos.

La obtención de glicósidos de bajo peso molecular, indican que la molécula es secuencialmente degradada en sus capas mas externas. Considerando este mecanismo de degradación, los resultados de metilación y los de oxidación con periodato, fué posible sugerir una estructura parcial para el galactano de *Strophocheilus oblongus*.

## ABSTRACT

The galactan from albumen gland of Strophocheilus oblongus was submitted to controlled Smith degradation and after three treatments, the degraded polysaccharide was isolated in 4% yield.

The results of methylation of the first and second degraded polysaccharide showed an accumulative increase of 2,4,6-tri-, a decrease of 2,3,4,6-tetra- and 2,4-di- (equimolecular proportion) and a large variation in the amount of 2,3,4-tri-O-methyl-D-galactose derivatives. The large variation of 2,3,4-tri-O-methyl-D-galactose observed during the degradative procedures means that the residue which originates the 2,3,4-tri-O-methyl-D-galactose in one degradation is destroyed in the subsequent one. This observation in addition to the elimination of non-reducing end group indicates that the molecule is degraded from the terminal groups and some internal residues.

On the other hand, the isolation of glycosides of lower molecular weight, indicates that the molecule is sequentially degraded from the most external layers.

Considering this mechanism of degradation and its results of methylation and periodate oxidation it was possible to suggest a partial structure for the galactan of Strophocheilus oblongus.

INDICE	Pagina
Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
Introdução.....	1
<u>Materiais e Métodos</u> .....	5
<u>1.</u> - Métodos gerais.....	5
<u>2.</u> - Isolamento e purificação do galactano.....	7
<u>3.</u> - Oxidação do galactano com periodo de sódio.....	7
<u>4.</u> - Degradação de Smith do galactano..	8
<u>5.</u> - Degradação controlada de Smith do galactano.....	9
a. - Oxidação.....	9
b. - Redução.....	10
c. - Hidrólise ácida do polialcool..	10
<u>6.</u> - Metilação do galactano.....	12
<u>7.</u> - Metanólise do galactano e dos polissacarídeos degradados após metilação.....	13
<u>Resultados e Discussão</u> .....	14
<u>1.</u> - Caracterização do galactano.....	14
<u>2.</u> - Metanólise do galactano e dos polissacarídeos degradados após metilação.....	14
<u>3.</u> - Degradação de Smith controlada.....	17



a. - Polissacarídeo degradado.....	17
b. - Análise dos produtos degradados.....	18
<u>4.</u> - Degradação de Smith.....	19
<u>5.</u> - Possibilidade estrutural.....	19
Bibliografia.....	37

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1 - Eletroforese de Tiselius do galactano	22
Figura 2 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-200 do galactano e dos polissacarídeos resultantes da primeira e segunda degradações.....	23
Figura 3 - Mecanismo da degradação de Smith controlada.....	24
Figura 4 - Determinação do consumo de periodato do galactano e dos polissacarídeos resultantes da primeira e segunda degradações.....	25
Figura 5 - Modelo parcial sugerido para o galactano isolado da glândula de albumen de <u>Strophocheilus oblongus</u> ...	26
Figura 6 - Primeira degradação: modelo sugerido para o polissacarídeo degradado	27
Figura 7 - Segunda degradação: modelo sugerido para o polissacarídeo degradado.....	28

## INDICE DE TABELAS

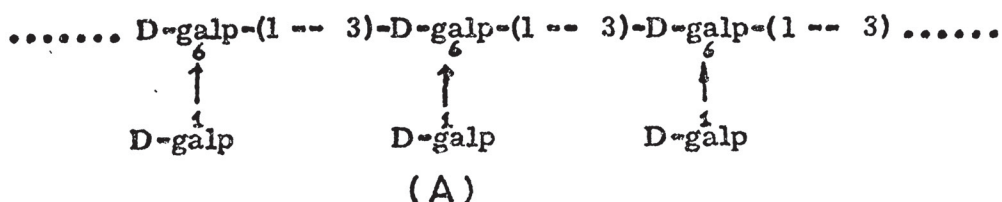
	Página
Tabela I - Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise de galactano metilado.....	29
Tabela II - Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise do polissacarídeo após primeira degradação.....	30
Tabela III - Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise do polissacarídeo após segunda degradação.....	31
Tabela IV - Degradação controlada de Smith em galactano de <u>Strophochæilus oblongus</u> ..	32
Tabela V - Análise por g.l.c. dos produtos degradados após sucessivas degradações controladas de Smith.....	33
Tabela VI - Análise por g.l.c. dos produtos da degradação de Smith.....	34
Tabela VII - Comparação dos resultados experimentais de metilação com os obtidos do modelo proposto.....	35
Tabela VIII - Comparação dos resultados experimentais de oxidação com periodato com os teóricos obtidos do modelo proposto....	36

## INTRODUÇÃO

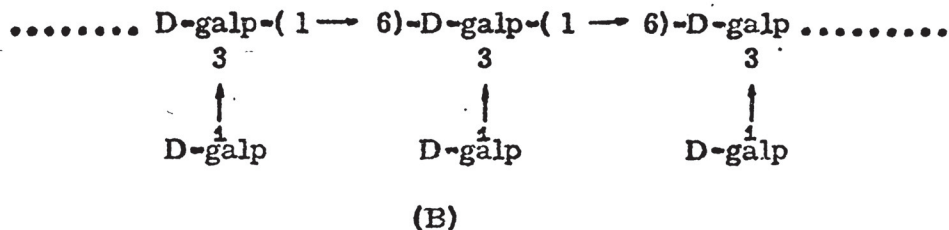
Em 1885, Hammarsten (1) extraiu da glândula de albúmen de Helix pomatia um polissacarídeo que não correspondia em suas propriedades ao glicogênio e que recebeu naquela época o nome de "Tierisches sinistrin".

Posteriormente May (2) isolou um polissacarídeo de massa de ovos de Helix pomatia que apresentava uma rotação ótica de  $-22,73^\circ$ . Embora galactogênio de glândula de albúmen e de massa de ovos de moluscos tenham sido amplamente investigados do ponto de vista químico por May (3 - 7), May e Weinland (8) e Weinland (9-10), os estudos estruturais propriamente ditos, nestes polímeros, só começaram com Schlubach e Loop (11) em 1937. Estes últimos autores metilaram galactogênio isolado das partes moles totais de Helix pomatia e por hidrólise do polímero metilado encontraram quantidades equimoleculares de derivados di e tetra-metil-D-galactose, os quais só foram identificados posteriormente como sendo 2,3,4,6-tetra-O-metil e 2,4, di-O-metil-D-galactose por Baldwin e Bell (12). Baseados em seus dados de metilação, Baldwin e Bell propuseram duas possibilidades estruturais para o galactogênio de Helix pomatia, conforme modelos (A) e (B).

O modelo (A) apresenta uma cadeia linear formada de unidades de D-galactose com ligações glicosídicas do tipo (1  $\rightarrow$  3), as quais se ligam cadeias laterais formadas de uma unidade de D-galactose mediante ligações glicosídicas do tipo (1  $\rightarrow$  6).



O modelo (B) difere do (A) apenas na inversão dos tipos de ligações glicosídicas de suas cadeias.



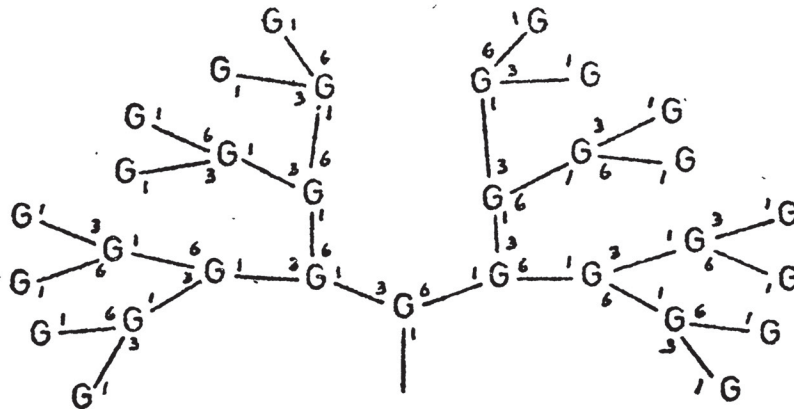
Baldwin e Bell para explicar a ausência de derivados trimetilados em seus modelos, sugeriram a hipótese de estruturas cíclicas, nas quais não existiriam grupos terminais.

Posteriormente, Bell e Baldwin (13) reestudando a química do galactogênio de Helix pomatia verificaram a presença de resíduos de galactose com configuração D e L numa proporção de 6:1. Procurando aperfeiçoar seu modelo estrutural, propuseram uma unidade molecular de galactogênio com uma cadeia linear de tres resíduos e quatro resíduos nas cadeias laterais estando um deles na configuração L.

Embora estes autores tivessem encontrado derivados trimetilados em seus experimentos com galactogênio, preferiram considerá-los como resíduos incompletamente metilados e portanto sem nenhum significado estrutural. Deste modo os autores eliminaram a possibilidade de uma molecula altamente ramificada, como fora vagamente sugerido.

O<sup>o</sup> Colla (14) aplicando a degradação de Barry (15) em galactogênio de H. pomatia, demonstrou como improváveis as estruturas propostas por Baldwin e Bell (12-13). Uma degradação do modelo (A) pelo método de Barry removeria as cadeias laterais e restaria uma cadeia que não seria suscetível a uma posterior oxidação. Por outro lado a degradação do modelo (B) deixaria uma cadeia linear que permitiria apenas uma segunda oxidação.

O<sup>o</sup> Colla baseando-se nos dados de metilação obtidos por Bell e Baldwin e nos seus próprios resultados provenientes das sucessivas degradações de Barry, propôs uma estrutura altamente ramificada tipo arboriforme, com ligações alternadas do tipo (1 → 3) e (1 → 6) para o galactogênio de H. pomatia em que a soma dos resíduos terminais não redutores eram em quantidades equimoleculares com os resíduos internos, conforme modelo (C). Este investigador sugeriu a possibilidade de seu modelo ser básico para todos os galactanos de molusco.



(C)

Uma estrutura semelhante a de O<sup>o</sup> Colla foi proposta por Correa, Dmytraczenko e Duarte (16) para galactano de glândula de albúmen de Biomphalaria glabrata, mediante resultados obtidos por oxidação com periodato e degradações de Barry.

Duarte e Jones (17) estudando galactano de glândula de albúmen de Strophocheilus oblongus por técnicas de metilação, demonstraram a presença de quantidades equimoleculares de 2,4 di-O-metil (43%) e 2,3,4,6 tetra-O-metil-D-galactose (43%) além de alta proporção do

derivados trimetilados como 2,4,6-tri-0-metil-(11%), 2,3,4-tri-0-metil-(2,5%) e traços de 2,3,6-tri-0-metil-D-galactose (0,5%). Embora esses autores não apresentassem um modelo estrutural para esse polímero, seus resultados abalavam os modelos estruturais propostos para galactanos isolados de outros moluscos. Recentemente Duarte, Diaz e Moretto (18) também demonstraram a presença de derivados trimetilados (29%) (2,4,6-tri-0-metil, 19,5%; 2,3,6-tri-0-metil, 6,7%; 2,3,4-tri-0-metil-(D-L)-galactose, 2,8%) em produtos metanolizados de galactano metilado de B. glabrata, além de quantidades equimoleculares de 2,4-di-0-metil-(35,7%) e 2,3,4,6-tetra-0-metil-(D-L)-galactose (35,7%).

As estruturas de galactano de moluscos não estão completamente esclarecidas e as investigações mais recentes neste setor demonstram que esses polímeros apresentam uma estrutura mais complexa do que aquelas anteriormente sugeridas por diversos autores. Levando em consideração estes fatos, o presente trabalho tem por finalidade contribuir para o esclarecimento da estrutura fina de um polissacarídeo isolado da glândula de albúmen de Strophochelus oblongus.

O plano de trabalho para alcançar esta finalidade consiste no estudo por metilação e oxidação com periodato dos polímeros de galactano por sucessivas degradações controladas tipo Smith.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. - Metódos gerais.

A análise electroforética ( Tiselius ) foi realizada em aparelho modelo 38A da Perkin Elmer com tampão borato de sódio (0.05M, pH 9,2) a 20 mA e 150 V. A electroforesis em papel acetilado foi feita em aparelho da Fariem Ltda. utilizando câmara de imersão da Chemetron de acôrdo com método de Dudman e Bishop (19). O espectro de absorção infra-vermelho (I.V.) foi determinado em espectrofotometro modelo IR-8 da Beckman (pastilha de KBr a 1%).

As rotações óticas foram medidas em polarímetro modelo 141 da Perkin Elmer a 25° C. A cromatografia em fase gasosa (G.L.C) foi realizada em cromatógrafo modelo 81OR-12 da F & M, utilizando-se ionização de chama e hélio como gas de arrastre (55 ml/min.). Para os derivados de açúcares as seguintes colunas foram utilizadas: (a) 15% (p/p) de poliester de succinato de butano-1,4-diol sobre celite de 80-100 mesh coluna de 120 x 0,4 cm. (D.I) a 185° C. (20); (b) 10% (p/p) de polifenil éter (m-bis(m-fenoxifenoxi) benzeno) sôbre celite de (c) 80-100 mesh, coluna de 120 x 0,4 cm. (D.I) a 185° (20); 14% (p/p) LAC4R-886 sôbre chromosorb W de 80-100 mesh (DMSC) coluna de 100 x 0,4 cm. (D-I) a 160°C; (d) 1:1 (v/v) da mistura de 10% poliester de butanodiol succinato sobre chromosorb W de 60-80 mesh e 10% (p/p) de ápiezon M sobre chromosorb W 60-80 mesh coberto com prata, coluna de 120 x 0,4 cm. a 175°C. Os produtos utilizados em G.L.C. foram fornecidos pela Chromatographic Specialities Brockuille, Canada, exceto o chromosorb W coberto com prata (Instrumentos Cientificos C.G. Ltda., São Paulo, Brasil.



A coluna (c) foi utilizada para análise quantitativa de açúcares metilados de acordo com Stephen et al (21). As áreas foram calculadas pelo método de triangulação. Os tempos de retenção (T) dos açúcares metilados em G. L. C. foram relacionados com o de metil-2, 3, 4, 6-tetra-O-metil-  $\beta$  -D-glucosídeo. Os tempos de retenção (T) também foram comparados com padrões de açúcares metilados.

Os açúcares acetilados foram analisados por cromatografia em fase gasosa, coluna (d), segundo Gunner, Jones e Perry (22), utilizando-se hélio como gás de arrastre (80ml/min.) e os tempos de retenção foram referidos ao L-arabitol penta acetato e comparados com padrões de açúcares acetilados. Análise quantitativa dos açúcares acetilados foram feitos segundo Sawardeker, Sloneker e Jeanes (23).

A cromatografia em papel foi realizada pelo método descendente em papel Whatman nºs 1, 4 e 3MM com os seguintes sistemas de solventes (v/v): (e) 1:5:3:3 (fase superior) benzeno-n-butanol-piridina-água; (f) 8:2:1 acetato de etila-piridina-água; (g) 9:2:2 acetato de etila-piridina-água. Os valores  $R_{gl}$  foram referidos ao movimento relativo da galactose. Os açúcares foram visualizados com nitrato de prata alcalino (24). A cromatografia em camada delgada (T. L. C.) dos açúcares acetilados foi realizada em placas de alumínio (20 x 20 cm.) cobertas com sílica gel G segundo Stahl (Merck), utilizando-se os seguintes sistemas de solventes (v/v): (h) 9:1 benzeno-metanol; (i) 20:1 benzeno-acetato de etila; (j) 5:1 cloroformio-metanol. Este tipo de cromatografia foi

utilizado para testar os produtos dos diversos processos de acetilação. Os açúcares da placa foram visualizados com solução a 5% de ácido sulfúrico em metanol seguido por aquecimento em estufa a 150°C.

A acetilação dos açúcares foi realizada por dois processos: (I) anidrido acético-piridina 1:1.3 (v/v) a 100°C; (II) anidrido acético ácido perclórico a 70% 14:0.1 (v/v) a 35°C, com agitação constante durante duas horas (25).

Hidrolise total do galactano foi realizada em ampola fechada com ácido sulfúrico 1 N a 100°C., por 5-6 horas e o excesso de ácido foi eliminado por precipitação com carbonato de bário a pH 4, 5. O açúcar total foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (26). Os Pontos de Fusão (P. F.) foram determinados em aparelho HMK 69/268L. As substâncias redutoras foram testadas pelo método do feniltetrazolium (27). O derivado tris p-nitrobenzoato glicerol foi preparado segundo o método clássico (36).

## 2. - Isolamento e purificação do galactano.

Os moluscos, Strophocheilus oblongus, utilizados no presente trabalho foram coletados em São Borja, Rio Grande do Sul. O galactano foi extraído da glândula de albúmen de acordo com processo descrito por Duarte e Jones (17). De 100 glândulas de albúmen foram obtidos 23 g de pó cetônico, do qual foram extraídos 8 g de polissacarídeo (34%) com  $[\alpha]_D^{25} + 21^\circ$  (C, 0,96 em água).

## 3. - Oxidação do galactano com periodato de sódio.

Uma amostra de polissacarídeo original (100mg) e dos polissacarídeos degradados foi oxidada com m-periodato de sódio

(Merck) 0,05 M (50 ml), na ausência de luz a 0-2°C., durante 120 horas. Aliquotas (1 ml) da solução oxidante foram retiradas com diferentes intervalos de tempo para determinação do consumo de periodato de acordo com Neumuller e Vasseur (28). O ácido fórmico liberado no meio da reação foi determinado por método colorimétrico (29) e por titulação potenciométrica (30) em atmosfera de nitrogênio. Como referência (branco) para ambos métodos foi utilizada uma solução de m-periodato de sódio 0,05 M (50 ml). Uma amostra de glicogênio analisada simultaneamente apresentou um consumo de periodato de 0,95 mol/mol de anidro hexose.

O consumo de periodato foi calculado da seguinte forma:

$$X = \frac{(B-A) \times N \text{ tiosulfato} \times \text{vol. total sol. oxid.} \times 81 \times 10^{-3}}{\text{ml de aliquota} \times \text{gs. de polissacarídeo.}}$$

B = ml de tiosulfato gastos no branco.

A = ml de tiosulfato gastos na amostra.

Os moles de ácido fórmico liberado por mol de hexose anidro (Y) foram determinadas, no caso da titulação, de acordo com a seguinte equação:

$$Y = \frac{\text{ml soda} \times N \text{ soda} \times \text{vol. total sol. oxid.} \times 162}{\text{ml aliquota} \times \text{gs. polissacarídeo} \times 1.000}$$

Com os dados obtidos para consumo de periodato em diferentes tempos, foi construído um gráfico (moles de periodato vs tempo) e os valores de consumo de periodato foram extrapolados para o tempo zero.

#### 4. - Degradação de Smith do galactano (31).

Amostras do polissacarídeo original e dos polissacarídeos degradados foram oxidados com periodato de sódio como acima descrito. Ao fim de 120 horas foi acrescentado etilenoglicol (1 ml) à

à mistura oxidante para destruir o excesso de periodato ( 2 horas). Em seguida a solução foi dializada contra água corrente ( 24 horas), concentrada a vácuo ( 25 mm Hg a 45°C) e submetida a uma segunda oxidação durante 30 horas nas mesmas condições anteriormente descritas. O polialdeído resultante desta oxidação foi reduzido com boridreto de sódio ( Sigma ), ( 3 x 100 mg), durante 12 horas. O excesso de boridreto foi destruído com ácido acético 2 N e após diálise contra água corrente ( 24 horas ) a solução foi concentrada a vácuo. O poliálcool resultante desta redução foi hidrolisado com ácido sulfúrico 1 N ( 10 ml )durante 5 horas a 100°C. A solução foi neutralizada com carbonato de bário a pH 4,5 e reduzido com boridreto de sódio ( 2 x 100 mg) durante 24 horas. Após redução o excesso de boridreto foi destruído com ácido acético 2 N, a solução foi deionizada em coluna ( 10 x 2.5 cm ) de Dowex 50 x 8 de 200-400 mesh forma H. O eluato foi concentrado à vacuo e foi sucessivamente lavado com metanol (8x10 ml) para eliminar o ácido bórico resultante dos processos de redução e os alditóis assim obtidos foram acetilados e analisados por G. L. C. (22).

5. - Degradação controlada de Smith do galactano. (32, 33).

a. - Oxidação.

O polissacarídeo ( 3,9 g ) foi oxidado com solução de m-periodato de sódio 0.05 M. (500 ml) na ausência de luz e a 0-2°C., durante 120 horas. Após destruir o excesso de periodato com etilenoglicol ( 10 ml ) durante duas horas, a solução foi dializada( 5x2 L ) em água destilada, concentrada a vacuo e o resíduo obtido foi submetido a uma segunda oxidação durante 30 horas em condições semelhantes às anteriores, mas utilizando-se metade

do volume da solução oxidante (250 ml).

Os volumes dos dialisados das duas oxidações foram desprezados por não conterem carboidratos quando testados pelo método-fenol-ácido sulfúrico e feniltetrazolium e cromatografia em papel (solvente e).

#### b. - Redução.

O polialdeído obtido foi dissolvido em água (100 ml) e reduzido com boridreto de sódio (4.0 g) durante 48 horas. O excesso de boridreto foi destruído com ácido acético 2 N. Após dialise e concentração a vácuo, o resíduo foi novamente reduzido com boridreto de sódio por mais duas vezes. Após tres sucessivas reduções com boridreto a solução apresentou reação negativa com feniltetrazolium o que era indicativo de completa redução do polialdeído.

Os volumes dos dialisados das tres reduções foram desprezados por não conterem carboidratos quando testados por fenol-ácido sulfúrico, feniltetrazolium, e cromatografia em papel, (solvente e).

Durante os processos de redução com boridreto de sodio, o pH do meio de reação foi mantido em torno de 9 pelo acréscimo de ácido bórico a fim de minimizar os efeitos da degradação por  $\beta$ -eliminação.

#### c. - Hidrólise ácida do polialcool.

O polialcool foi submetido à hidrólise com ácido sulfúrico 0.5 M., (500 ml) e à temperatura ambiente (18-25°C) por 60 horas. Após diálise (10 x 2 L) e concentração à vácuo do material não dialisável, (polissacarídeo degradado) uma amostra deste material (5 mg) foi hidrolisada com ácido sulfúrico

1 N ( 5 horas a 100°C ) e a análise do dulcitol acetato por G. L. C. (coluna d) e em papel ( solvente e ), demonstraram a presença de galactose e glicerol. Por este motivo o material foi submetido a uma segunda hidrólise com ácido sulfúrico 0.5 M. ( 250 ml) a temperatura ambiente durante 30 horas. Após nova diálise (5x2 L) e concentração a vácuo do material não dialisável, uma amostra do polissacarídeo degradado submetida a hidrólise total não revelou a presença de glicerol ( G. L. C. ) e desta maneira as condições de hidrólise foram consideradas satisfatórias.

No polissacarídeo degradado foi determinado o consumo de periodato e o ácido fórmico liberado. O polissacarídeo degradado foi também submetido a degradação de Smith e a metilação por diversos métodos. Não foi possível se demonstrar fragmentação da molécula de galactano e dos polissacarídeos degradados por cromatografia em coluna de sephadex G-200 (120 x 2,5 cm) que pudessem ser atribuídas aos processos de oxidação e redução. O material dialisável (produto degradado) das duas hidrólises foi reunido, eliminando o excesso de ácido por precipitação. Após centrifugação a 5.000 g (10 min.), filtração e concentração a vácuo, uma amostra deste produto degradado (50 mg) foi reduzida com boridreto de sódio (3 x 50 mg), hidrolisada, acetilada e os alditóis acetatos obtidos foram analisados por GLC ( coluna d). Uma outra amostra dos produtos de degradação sem reduzir foi cromatografada em papel ( solvente e ) demonstrando a presença de vários glicosídeos além de etilenoglicol e glicerol. Por cromatografia em coluna de sephadex G-25 (120 x 2,5 cm), eluição com água, foi possível se isolar dos produtos degradados uma fração de glicosídeos, a qual por cromatografia preparativa em papel(solvente f) deu duas sub

frações ( I e II ). Na primeira degradação o rendimento das frações ( I e II ) foi de aproximadamente 5% ( 62 mg ) com relação aos produtos degradados ( 1.230 mg ). As duas subfrações após hidrólise ácida e análise de seus alditóis acetatos por GLC ( coluna d ) apresentou uma relação dulcitol:glicerol de 3,7:1 para a subfração (I) e 4,5:1 para a subfração (II). Por outro lado, uma amostra (15 mg) das frações ( I ) e ( II ) foi tratada com boridreto de sódio ( 3 x 5 mg ) por 12 horas, hidrolisada e a análise de seus alditóis acetatos por GLC ( coluna d ) demonstrou apenas a presença de galactose e glicerol, a ausência de dulcitol nesta experiência demonstrou que não existem extremidades redutoras livres nestas frações. As frações ( I ) e ( II ) foram caracterizadas como glicosídeos de glicerol.

#### 6. - Metilação do galactano.

Uma amostra de polissacarídeo ( 200 mg ) foi metilada 4 vezes pelo método de Haworth ( 34 ). Após neutralização com ácido sulfúrico 6 N a pH 7,0 ( 0-2°C. ), a solução livre de sais ( diálise contra água corrente por 24 horas ) foi concentrada a vácuo. O resíduo obtido foi suspenso em tetrahidrofurano ( 5,0 ml ) e tratado com uma mistura de sulfato de metila ( 1,2 ml ) e hidróxido de sódio pulverizado ( 1,0 g ) com agitação constante ( agitador magnético ) e à temperatura ambiente ( + 25°C ) por 16 horas ( 35 ) A mistura de reação neutralizada com ácido sulfúrico ( 6N e pH 7,0 ) foi dializada contra água corrente por 24 horas e concentrada a vácuo. No xarope obtido este processo de metilação foi repetido por mais tres vezes. Em seguida o polissacarídeo parcialmente metilado foi solubilizado em sulfoxido de metila ( 10 ml ) e tratado

com sulfato de metila ( 1.0 ml ) e hidróxido de sódio pulverizado ( 2.0 g ) com agitação constante e à temperatura ambiente por 8 horas ( 35 ). A mistura de reação foi neutralizada com ácido sulfúrico ( 6 N, pH 7 ), dializada contra água corrente por 24 horas e concentrada a vácuo. No xarope obtido, este processo de metilação foi repetido por mais três vezes. Finalmente, após sucessivas metilações segundo Purdie ( 34 ) ( 3 vezes ) o polissacarídeo não apresentou mais absorção de grupos hidroxilos no espectro infra-vermelho. Rendimento de 60%, após 15 metilações.

7. - Metanólise do galactano e dos polissacarídeos degradados após metilação.

Uma amostra de polissacarídeo metilado (120 mg) foi suspensa em solução de ácido clorídrico a 7% em metanol (2.0ml) e aquecido por 6 horas a 100°C em tubo fechado. Após neutralização com carbonato de prata, filtração e concentração do filtrado a vácuo ( 25 mm Hg, 30-35°) a mistura dos derivados metilados (xarope) foi analisada por G. L. C., utilizando-se as colunas (a), (b) e (c). Os polissacarídeos degradados foram metilados e metanolizados de maneira semelhante como está acima descrito.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. - Caracterização do galactano.

O polissacarídeo extraído da glândula de albúmen de Strophocheilus oblongus foi purificado de acordo com o processo descrito por Duarte e Jones (17) e denominado de galactano pelos mesmos autores. No presente trabalho conserva-se esta denominação. Este polímero mostrou-se indissociável pela análise eletroforética de Tiselius ( fig. 1 ) e em papel acetilado bem como por cromatografia em Sephadex G-200 ( fig. 2 ). Deste modo o polímero foi julgado apropriado para investigações estruturais. Por hidrólise ácida obteve-se apenas galactose

( p. f 166-168°C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 80,5$ , (C = 0,65 em água). A rotação ótica do hidrolisado indica que se trata de um polímero formado de resíduos de D-galactose, eliminando-se portanto a presença de L-galactose.

As rotações óticas observadas no polissacarídeo original (  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 21^{\circ}$ , (C = 0,52 em água), e nos polímeros degradados (  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 21^{\circ}$ , (C = 0,43 em água) e  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 10^{\circ}$  (C = 0,22 em água )) da primeira e segunda degradação, respectivamente aliados aos dados obtidos neste particular por Duarte e Jones (17) sugeriram que este polímero fosse formado principalmente, se não totalmente, de unidades de  $\beta$ -D-galactose.

### 2. - Metanólise do galactano e dos polissacarídeos degradados após metilação.

Os resultados da tabela I estão de acordo com os dados de metilação do galactano de Strophocheilus oblongus obtidos por Duarte e Jones (17), exceto no que se refere ao derivado 2, 3, 6-

tri-O-metil-D-galactose, não detectado no presente trabalho devido ao maior número de metilações efetuadas neste polímero (15 vezes). Os outros derivados trimetilados assinalados na tabela I (2,4,6 tri 11,1% e 2,3,4 tri-O-metil-D-galactose 2,5%) não foram considerados por Bell e Baldwin (13) no modelo proposto para galactano de Helix pomatia por considerá-los como resíduos incompletamente metilados. Entretanto esses derivados metilados foram bem caracterizados como trimetil por Duarte e Jones (17), quando estudaram o galactano metilado de Strophocheilus oblongus, com alto teor de grupos metoxi (MeOH: 44,4%). Nas estruturas altamente ramificadas propostas por O<sup>o</sup> Colla (14) para galactano de Helix pomatia e por Corrêa, Dmytraczenko e Duarte (16) para o galactano de Biomphalaria glabrata foi excluída a participação de cadeias lineares. Isto se deve em parte ao fato desses autores investigarem estes polímeros principalmente por técnicas de oxidação com periodato e degradação de Barry, que não oferecem a riqueza de informações dadas pelo processo de metilação.

Recentemente Moretto, Diaz e Duarte (18) verificaram também alta proporção de derivados trimetilados em galactano metilado de Biomphalaria glabrata e, deste modo os derivados trimetilados em galactano metilado são mais comuns do que anteriormente se julgava.

Após a primeira degradação do galactano ( tabela II ) observou-se uma diminuição na proporção de resíduos ramificados ( 2,4 - di-O-metil D-galactose, de 43,2% para 26,0%) e este fato é corroborado pelo decréscimo correspondente observado nos resíduos terminais não redutores (2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose, de 43,2% para 26,0%). Estes dados também demonstraram

que a degradação da molécula se processava na sua maior parte nas ligações glicosídicas dos resíduos terminais não redutores (reação de poda) levando a um aumento aparente dos derivados trimetilados nos polissacarídeos obtidos pelas sucessivas degradações. As variações desses derivados trimetilados devem ser interpretadas em conjunto com outros dados analíticos afim de limitarem as possibilidades estruturais. O aumento aparente de 2,4,6-tri-O-metil-D-galactose ( tabelas I, II ) ( de 11,1 para 30% ) observado durante o primeiro processo degradativo, originou-se de cadeias lineares do tipo ( 1  $\longrightarrow$  3 ) as quais estavam ramificadas nos carbonos 6 por unidades simples de galactose ou por grupos suscetíveis completamente à oxidação com periodato ( Fig. 3a e 3b resíduos 3, 4, 5 e 6). Por outro lado o aparecimento do maior número de derivados como 2,3,4-tri-O-metil-D-galactose ( tabela II ) ( de 2,5% para 18,0% ) verificado durante o primeiro processo de oxidação, resultou das unidades de galactose ( resíduos internos) que estavam unidas pelo seu carbono 3 a grupos suscetíveis completamente à oxidação com periodato e que apresentavam seus carbonos 1 e 6 ligados a grupos não suscetíveis à oxidação com periodato, conforme modelo da Fig. 3a resíduo 1.

A análise dos produtos de metanólise do polímero da segunda degradação ( tabela III ) demonstrou um comportamento semelhante ao da primeira degradação com aumento (aparente) considerável das cadeias lineares do tipo ( 1  $\longrightarrow$  3 ) ( de 30% para 51,7% de 2,4,6-tri-O-metil-D-galactose) e diminuição acentuada dos resíduos ramificados ( de 26% para 18% de 2,4-di-O-metil-D-galactose) e terminais não redutores ( de 26% para 18%

de 2, 3, 4, 6-tetra-0-metil-D-galactose). Deve-se ressaltar que o aumento percentual do 2, 3, 4-tri-0-metil-D-galactose observado nas degradações estudadas não é devido a um processo acumulativo já que os resíduos que lhes dão origem são formados numa degradação e destruídos na seguinte. Por este mecanismo o polímero também pode ser fragmentado nos resíduos internos da molécula dando origem aos glicosídeos de baixo peso molecular como os de tipo ( I ) e ( II ) cujo mecanismo de formação é ilustrado na figura 3 ( c ). Este mecanismo opera conjuntamente com o processo de poda na degradação da molécula.

### 3. - Degradação de Smith controlada.

#### 3.1 - Polissacarídeo degradado.

Durante a degradação controlada de Smith de um polímero é possível se obter uma grande variedade de glicosídeos, alcoóis - além de um polímero degradado. Ora, quando certos resíduos de um polissacarídeo são oxidados por periodato e reduzidos, os álcoois resultantes formam acetais e o mecanismo de degradação controlada é devido à maior instabilidade desses acetais à hidrólise ácida e à temperatura ambiente quando comparado com os glicosídeos ( 27 ). Por um mecanismo semelhante o galactano de Strophocheilas oblongus mostrou-se bastante suscetível às degradações controladas (tipo Smith) e após a terceira degradação (tabela IV) foi possível ainda obter-se um polissacarídeo degradado correspondente a 4% da molécula original. Os decréscimos do consumo de periodato e ácido fórmico liberado nestes polissacarídeos degradados

(Fig. 4 e tabela IV) estavam de acôrdo com os dados de metilação que indicaram um aumento aparente de resíduos com ligações glicosídicas do tipo ( 1 ---- 3 ) e uma diminuição acentuada dos resíduos ramificados e terminais não redutores. Os dados de oxidação com periodato analisados em conjunto com o aumento dos derivados trimetilados nos polimeros degradados ( após metilação ) e o aparecimento de glicosídeos do tipo ( I ) e ( II ), não eram compatíveis com uma estrutura semelhante à proposta por O' Colla para galactano de Helix pomatia.

### 3.2 - Análise dos produtos degradados.

De acôrdo com os modelos até agora propostos para galactanos de moluscos ( 14, 16 ), os produtos degradados das diferentes etapas de degradação deveriam conter somente glicerol. Entretanto a análise desses produtos degradados obtidos de galactano de Strophocheilus oblongus após hidrólise total e cromatografia preparativa em papel ( solvente f ) demonstrou a presença de glicerol ( tris-p-nitrobenzoato glicerol, p. f 193-195°C ) e galactose ( dulcitol hexa-acetato, p. f 170-172°C ) numa relação dulcitol:glicerol ( alditol acetato, GLC, coluna d ) que aumentava no decorrer das sucessivas degradações ( tabela V ).

A elevada proporção de glicerol ( 93,4% ) indicou que a molécula foi degradada principalmente nas extremidades não redutoras, durante a primeira degradação o que já fora sugerido pelos dados dados de metilação e, numa pequena proporção pelos resíduos internos ( 2,5% ) o que justificava o aparecimento de glicosídeos dos quais os mais abundantes eram os

do tipo ( I ) e ( II ). Nas demais degradações observou-se um maior aumento na degradação dos resíduos internos (aumento da relação dulcitol:glicerol, tabela V).

#### 4. - Degradação de Smith.

O galactano e os polissacarídeos degradados foram submetidos a degradação de Smith. Os produtos desta degradação foram isolados por cromatografia preparativa em papel (solvente f) e seus componentes identificados como sendo glicerol (tris(-p-nitrobenzoato) glicerol, p. f 193 - 195°C) e galactose (dulcitol hexa-acetato, p. f 170 - 172°C). Análise por GLC (alditol hexa-acetato, coluna d) desses produtos forneceu uma relação aproximada de 2:1 de dulcitol:glicerol (Tabela VI). Estes resultados confirmaram os de oxidação com periodato (Tabela IV). A ausência de treitol nesta degradação está de acordo com os dados de metilação que excluem a existência de ligações glicosídicas do tipo ( 1 → 4 ).

#### 5. - Possibilidade estrutural.

Com os dados de metilação e oxidação com periodato ( Tabelas VII e VIII ) dos polissacarídeos degradados aliados aos resultados analíticos dos produtos degradados, foi possível sugerir um modelo molecular para o galactano do Strophocheilus oblongus diferente dos anteriormente apresentados ( 12, 14 e 16 ). O modelo sugerido ( figuras 5, 6 e 7 ) foi possível desde que se concebe a molécula possuindo uma cadeia linear principal como fora inicialmente proposta por Baldwin e Bell (12) mas com vários tipos de ramificações de cadeias complexas que no seu conjunto se afastaria daquela con-

cepção de estrutura arboriforme proposta por O<sup>o</sup> Colla (14). A primeira dificuldade surgida nesse modelo foi se esclarecer o tipo de ligação glicosídica da cadeia principal. Embora a ligação glicosídica do tipo ( 1 → 6 ) não esteja completamente afastada, a mais provável seria a do tipo ( 1 → 3 ) a qual acumulou bastante ( 51,7% ) na segunda degradação, tabela III ) e acarretaria uma fragmentação gradativa e controlada da molécula, durante os processos degradativos.

Como já foi discutido anteriormente, a degradação controlada se processa não só nas extremidades não redutoras da molécula como também em seus resíduos internos.

Contudo, alguns aspectos da degradação interna devem ser esclarecidos. Se o polissacarídeo apresentasse os resíduos internos suscetíveis à degradação em pontos equidistantes da molécula, este seria degradado em vários fragmentos o que se refletiria no aparecimento de polissacarídeos degradados capazes de serem subfracionados pelo menos em parte, em coluna de Sephadex G-200, o que nunca ocorreu. Por outro lado o aparecimento de glicosídeos do tipo ( I ) e ( II ) nos produtos degradados, sugere que esses resíduos internos sejam postos a descoberto, sempre nas camadas mais externas do polímero degradado.

Embora esses resíduos internos tenham sido caracterizados por estudos de metilação ( 2,3,4-tri-O-metil-D-galactose ) e fragmentados durante os processos degradativos, é difícil por métodos químicos assegurar sua localização exata

dentro da molécula. Deste modo, o resíduo da molécula que dá origem ao derivado 2,3,4-tri-O-metil-D-galactose pode ser encontrado quer num ponto de ramificação da molécula quer no interior de uma cadeia linear do tipo ( 1  $\rightarrow$  3 ).

Uma evidencia indireta de que as cadeias lineares sejam formadas, principalmente, de resíduos de galactose com ligações glicosídicas do tipo ( 1  $\rightarrow$  3 ) com ramificações do tipo ( 1  $\rightarrow$  6 ), é o aumento crescente do derivado 2,4,6-tri-O-metil-D-galactose obtido após metilação dos polissacarídeos degradados. Isto não ocorreria no caso dessas cadeias lineares serem formadas por resíduos de galactose do tipo ( 1  $\rightarrow$  6 ) e ramificações do tipo ( 1  $\rightarrow$  3 ).

Entre as diversas possibilidades estruturais para o galactano de Strophocheilus oblongus a que mais concordou ( Fig. 5, 6 e 7 ) com os dados experimentais atuais ( Tabelas VII e VIII ) é a que apresentava as cadeias lineares formadas de ligações glicosídicas do tipo ( 1  $\rightarrow$  3 ) e ramificações do tipo ( 1  $\rightarrow$  6 ). Deve-se ressaltar que os métodos químicos utilizados, não permitem excluir a possibilidade da molécula estar construída de forma diferente, mas não similar à de O<sup>o</sup> Colla (modelo C).

Esta simplificação estrutural, a ser confirmada no futuro por métodos enzimáticos, é de grande interesse para a síntese biológica dessa molécula. Neste caso seriam necessárias apenas enzimas específicas para sintetizar a ligação ramificante e a cadeia linear.

As estruturas dos galactanos de molusco ainda são um desafio aos investigadores.



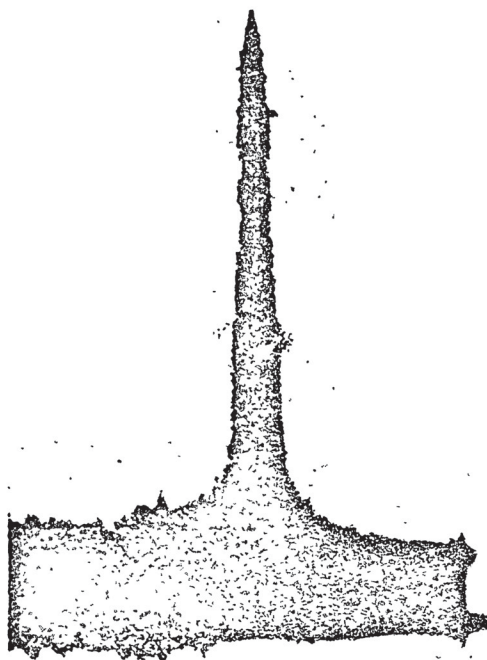


Figura 1 - Electroforesis de Tiselius do galactano de Strophocheilus oblongus. Realizada em aparelho modelo 38A da Perkin Elmer, (20 mA. e 150 V). Polissacarídeo foi analisado na concentração de 1% em solução de borato de sódio 0,05 M. pH 9,2.

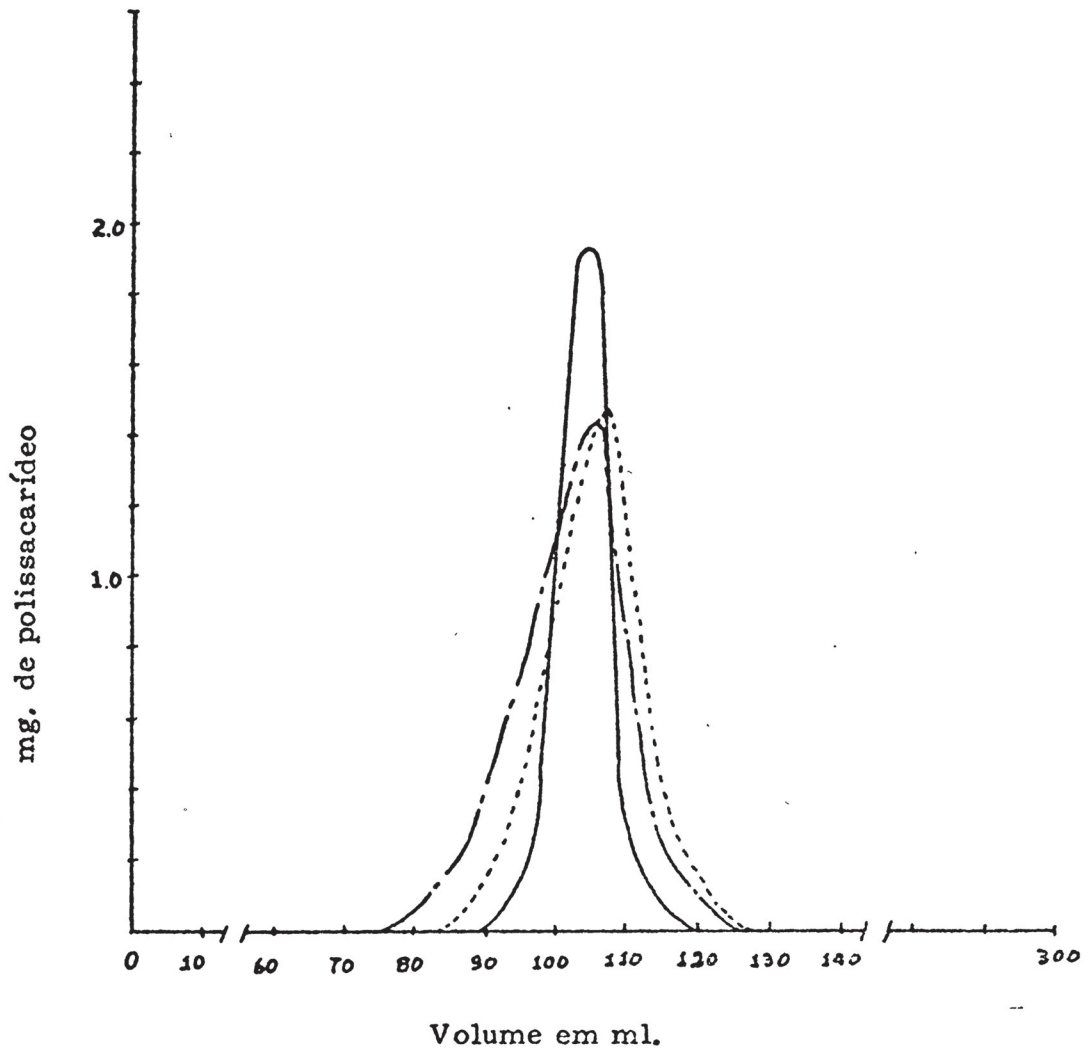
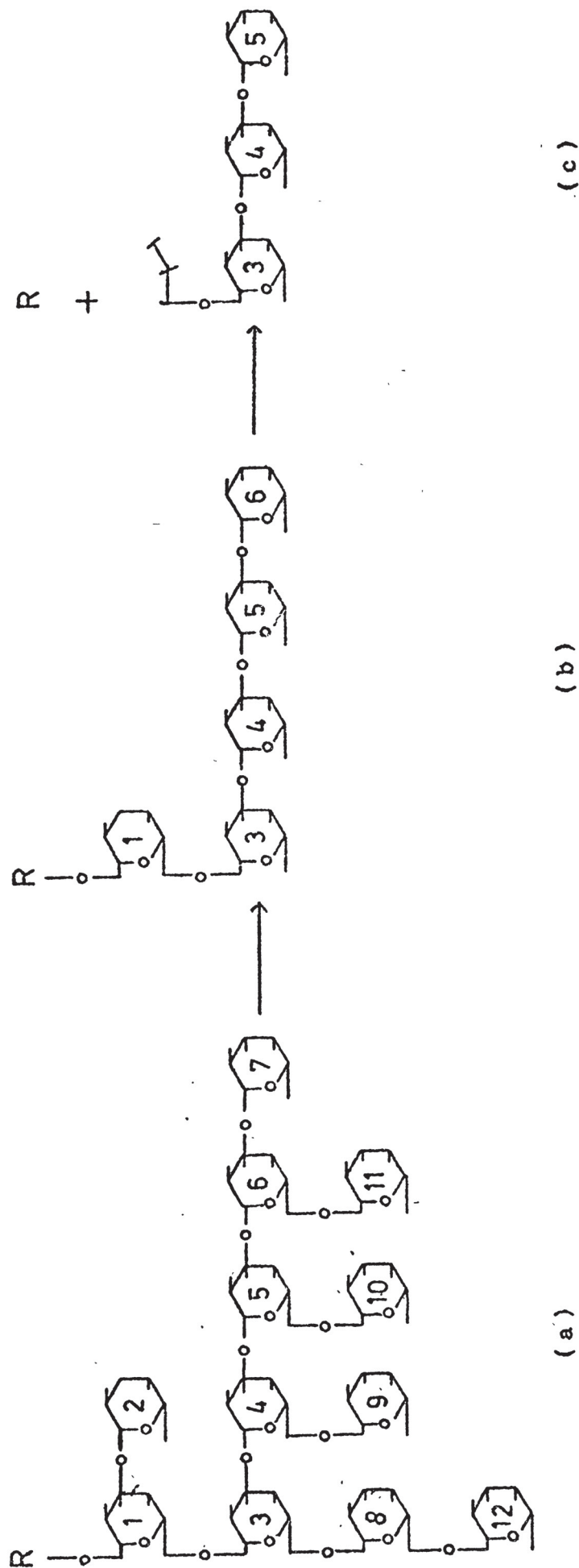


Figura 2 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-200 do galactano e dos polissacarídeos resultantes da primeira e segunda degradação. Foi utilizado coluna de 120 x 2,5 cm, eluição com água. O eluído foi dosado pelo método do fenol-ácido sulfúrico como galactose e corrigido para polissacarídeo, utilizando-se um fator de correção (0,9).

- Galactano. Recuperação 93%.
- Após primeira degradação. Recuperação 92%.
- ..... Após segunda degradação. Recuperação 92%.



( b )

( c )

Figura 3 - Mecanismo da degradação de Smith controlada.

Quando a unidade 2 ( a ) foi eliminada, a unidade 1 por metilação dava origem ao derivado 2, 3, 4-tri-O-metil-D-galactose ( b ); enquanto que a eliminação das unidades 8, 9 e 10 eram as responsáveis pelo aparecimento dos derivados 2, 4, 6-tri-O-metil-D-galactose. Após metilação das unidades 3, 4 e 5 ( b ). Eliminando-se a unidade 11 ( a ) forma-se um novo grupo terminal não redutor ( b, unidade 6 ) o qual antes do processo degradativo se apresentava como resíduo ramificado. A formação de glicosil-glicerol e do polissacarídeo degradado ( R ) foi ilustrado em ( c ) após sucessivas degradações.

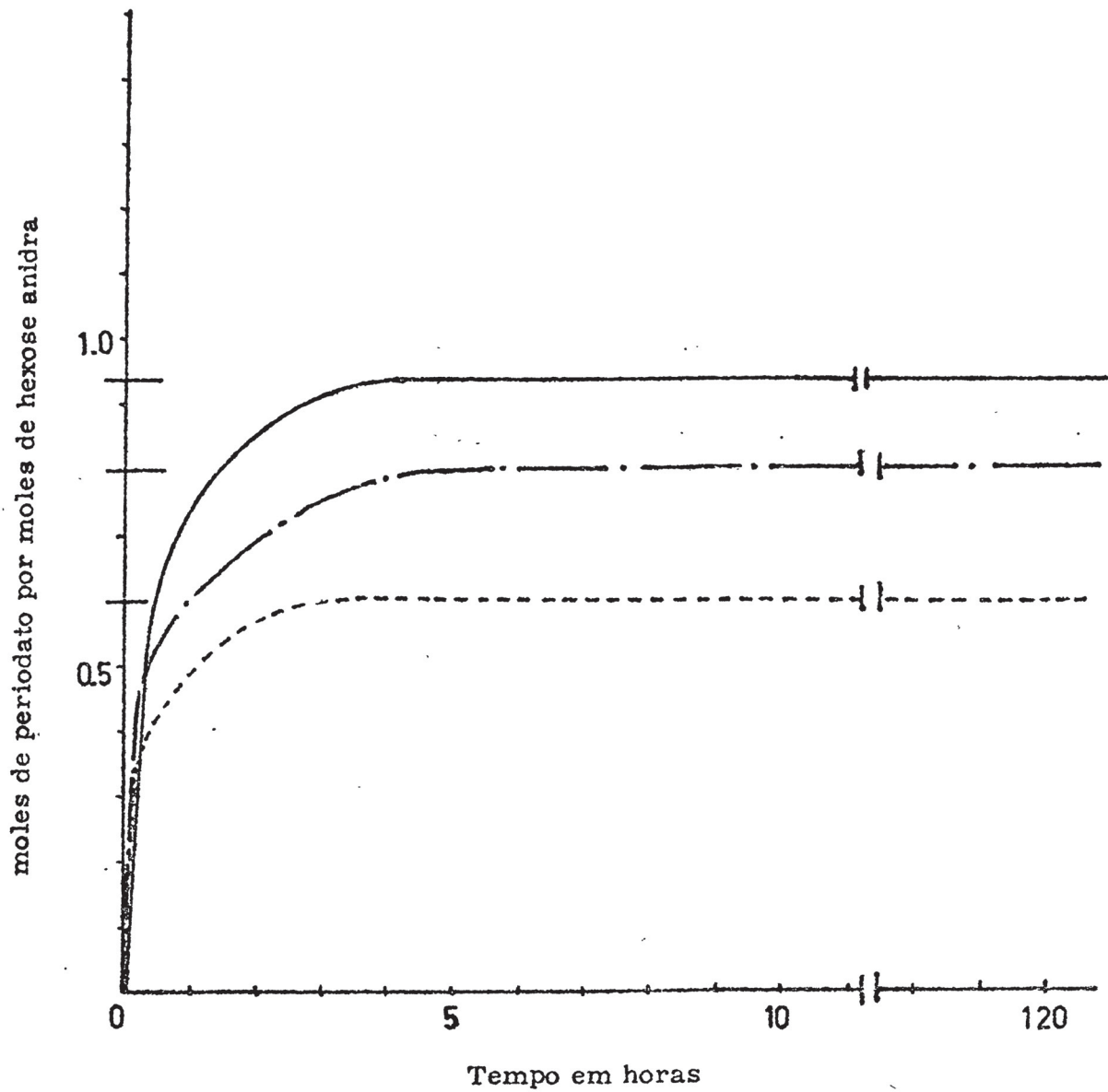
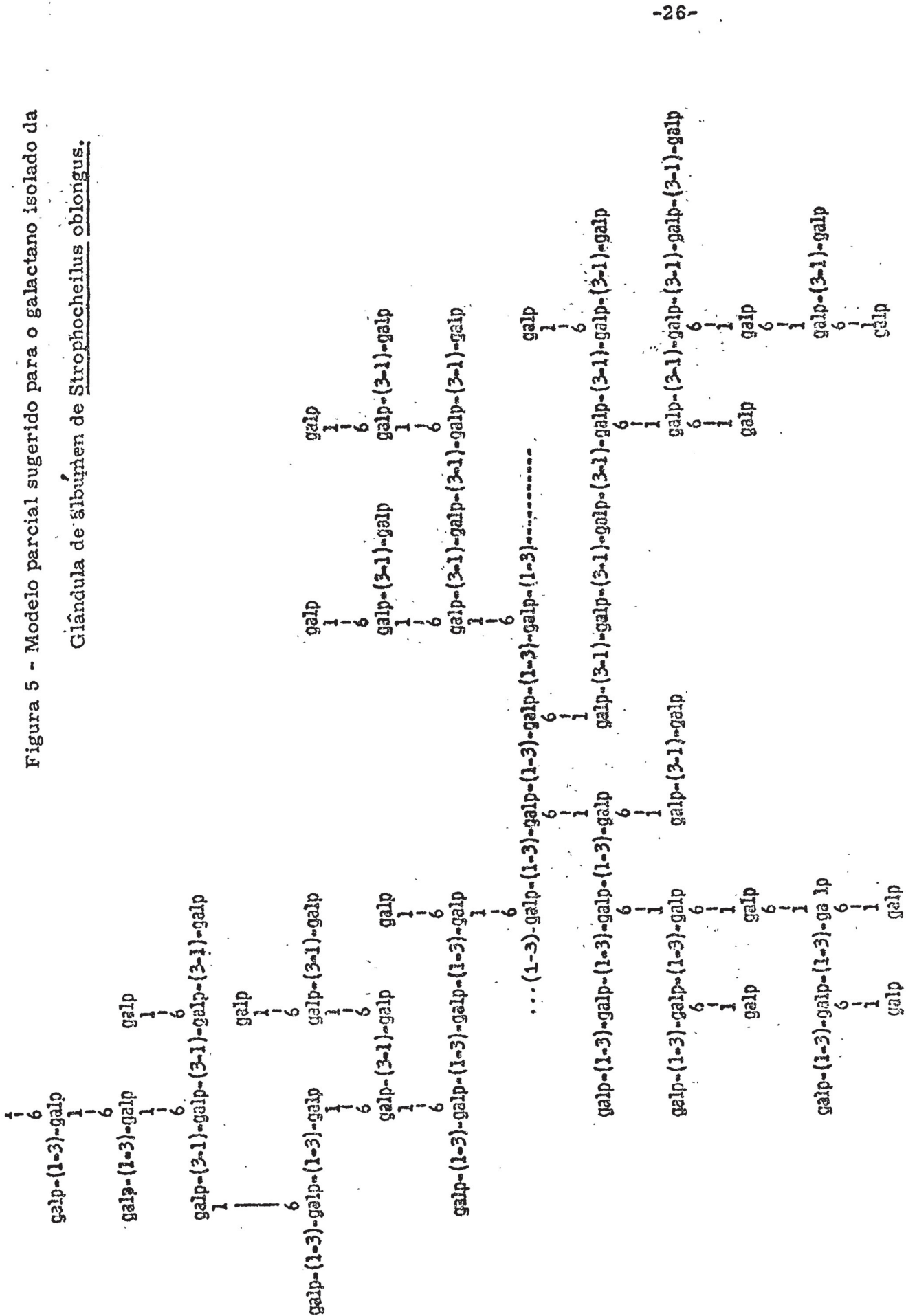


Figura 4 - Determinação do consumo de periodato do galactano e dos polissacarídeos resultantes da primeira e segunda degradações. Amostras foram coletadas a intervalos de tempo variáveis para determinação do consumo de periodato pelo método de Neumuller e Vasseur (28) e os valores obtidos foram extrapolados para o tempo zero.

- Galactano.
- Após primeira degradação.
- ..... Após segunda degradação.

Figura 5 - Modelo parcial sugerido para o galactano isolado da

Glândula de sibilantes de Strophocheilus oblongus.



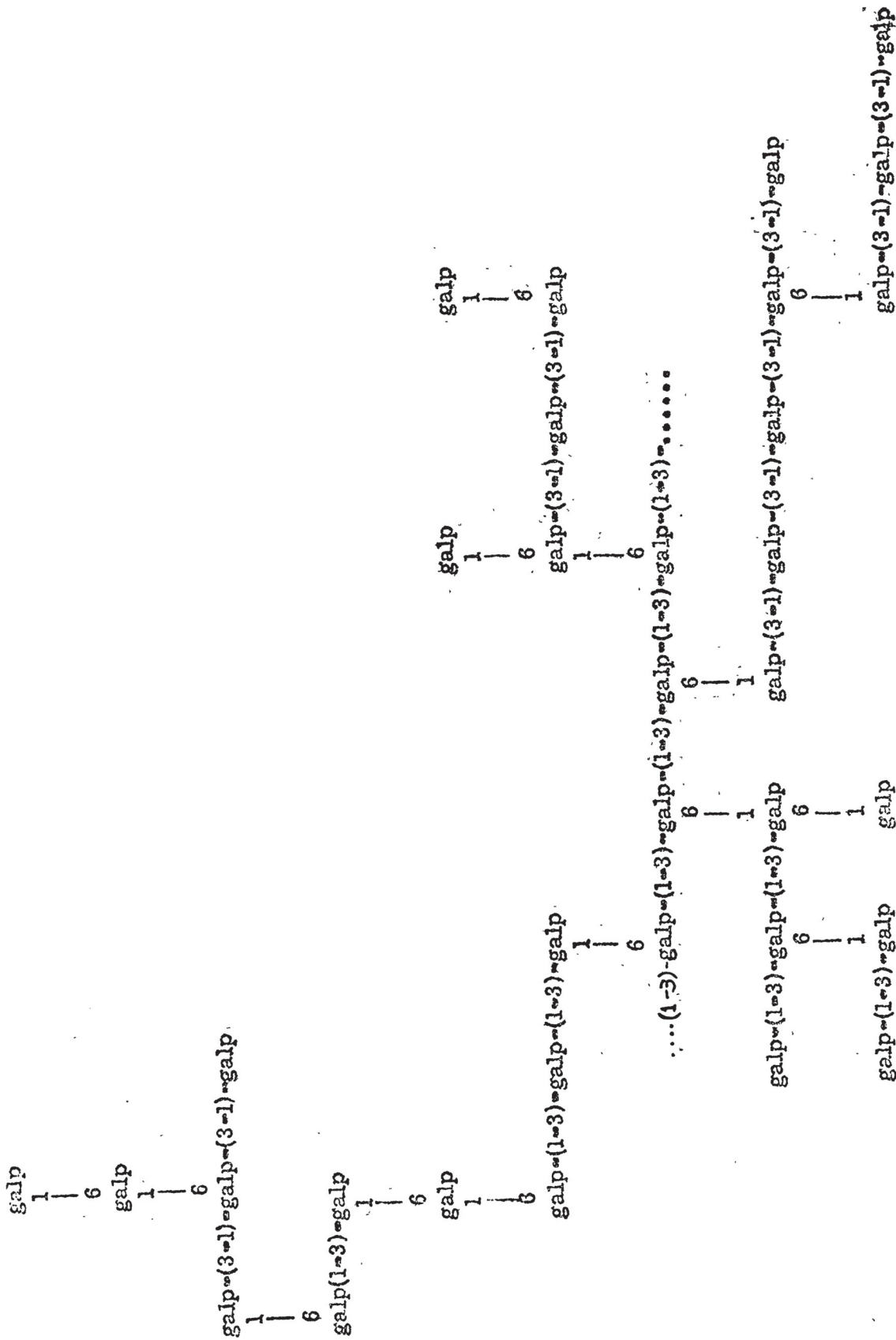


Figura 6 • Primeira degradação: modelo sugerido para o polissacarídeo degradado.

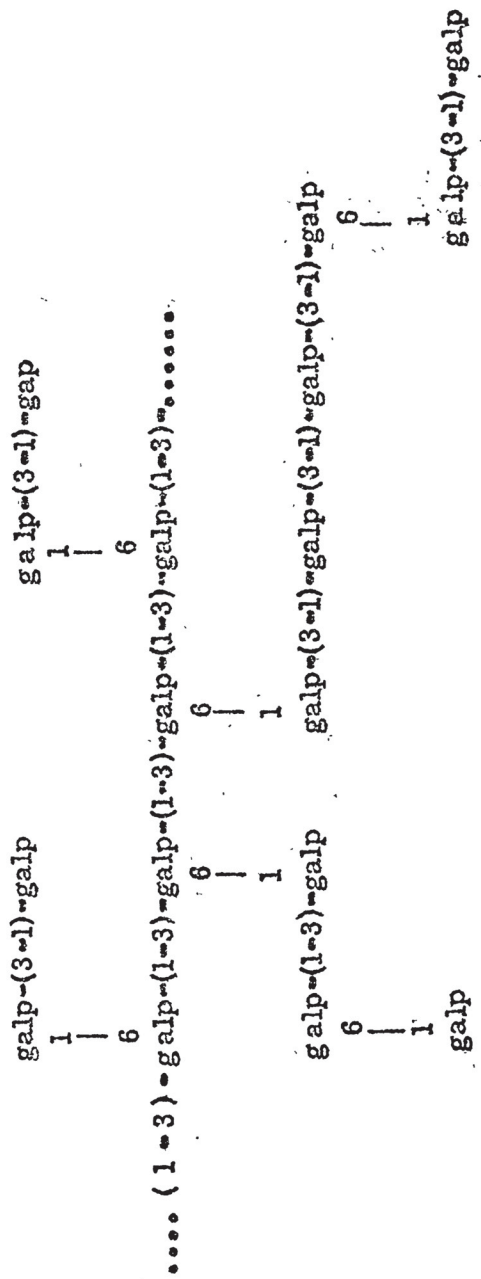


Figura 7 - Segunda degradação: modelo sugerido para o polissacarídeo degradado.

TABELA I

ANÁLISE POR GLC DOS PRODUTOS DE METANOLÍSE DO GALACTANO METILADO

O-metil-D-galactosídeo	Tempos relativos de retenção (T) <sup>a</sup>			% em moles
	Coluna (a)	Coluna (b)	Coluna (c)	
2,3,4,6-tetra	1,82	1,52 1,60	2,00	43,20
2,4,6-tri	4,20 4,77	2,10 2,38	5,05 6,02	11,10
2,3,4-tri	6,60	2,93	9,90	2,50
2,4-di	.....	3,74 4,40	25,43 30,00	43,20

<sup>a</sup> Tempo de retenção relativo ao metil 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosídeo.



TABELA II

Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise do polissacarídeo após primeira degradação.

O-metil-D-galactosídeo	Tempos relativos de retenção ( T ) <sup>a</sup>			% em moles
	Coluna (a)	Coluna (b)	Coluna (c)	
2,3,4,6-tetra-	1,80	1,50	2,07	26,00
2,4,6-tri-	3,92	2,04	5,16	30,00
2,3,4-tri-	6,52	2,71	9,90	18,00
2,4-di-	---	3,73	25,40	26,00

<sup>a</sup> Tempo de retenção relativo ao metil 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-glucosídeo...

TABELA III

Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise do polissacarídeo após segunda degradação.

O-metil-D-galactosídeo	Tempos relativos de retenção ( T ) <sup>a</sup>			% em moles			
	Coluna (a)	Coluna (b)	Coluna (c)				
2,3,4,6-tetra-	1,30	1,51	1,60	2,05	18,00		
2,4,6-tri-	3,92	4,39	2,04	2,35	5,15	6,06	51,70
2,3,4-tri-	6,50		2,71	2,95	9,90		12,30
2,4-di-	-----		3,74	4,35	25,60	29,85	18,00

<sup>a</sup> Tempo de retenção relativo ao metil 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-glucosídeo.

TABELA IV

Degradação controlada de Smith em galactano de Strophochéilus oblongus,

Degradações	Polissacarídeo		Produtos de degradação	Moles periodato		Moles ac. fórmico		Periodato Ac. fórmico
	degradado	%		mol hexose anidra	mol hexose anidra	mol hexose anidra	mol hexose anidra	
Original	3,90	100,00	g	0,94	0,41	2,2:1		
Primeira	2,00	51,30	1,23	0,80	0,35	2,2:1		
Segunda	1,07	27,50	0,90	0,60	0,27	2,2:1		
Terceira	0,17	4,00						

TABELA V

*(material do trabalho)*

Análise por g.l.c. dos produtos degradados após sucessivas degradações controladas de Smith.

Alditol acetato	Tempo relativo de retenção (T)	Primeira degradação % em moles	Segunda degradação % em moles	Terceira degradação % em moles
Glicerol tri-	0,09	93,40	70,60	67,45
Dulcitol hexa	3,15	6,60	29,40	32,55
Dulcitol:glicerol		0,07	0,41	0,48

\* Tempo de retenção relativo a L-arabitol penta-acetato (coluna d).

TABELA VI

*Poliss. degradado (π desalivado)*

Análise por g.l.c. dos produtos da degradação de Smith

Alditol acetato	Tempo relativo de retenção (T) <sup>a</sup>	Primeira degradação % em moles	segunda degradação % em moles
Glicerol-tri-	0,09	33,70	33,10
Dulcitol-hexa-	2,52	66,30	66,90
Dulcitol:glicerol		2:1	2:1

Tempo de retenção relativo a L-arabitol penta-acetato (coluna d).

TABELA VII

Comparação dos resultados experimentais de metilação com os obtidos do modelo proposto.

	Polissacarídeo original		Polissacarídeo após 1a. degradação		Polissacarídeo após 2a. degradação	
	E	T	E	T	E	T
2 2,3,4,6-tetra-	43,20	41,40	26,00	26,50	18,00	23,50
2,4,6-tri-	11,10	12,80	30,00	32,30	51,70	41,20
2,3,4-tri-	2,50	4,40	18,00	14,70	12,30	11,80
2,4-di-	43,20	41,40	26,00	26,50	18,00	23,50

E = dado experimental

T = dado teórico

TABELA VIII

Comparação dos resultados experimentais de oxidação com periodato com os teóricos obtidos do modelo proposto.

Degradações	Moles de periodato por		Moles de ácido fórmico por		Relação periodato:	
	mol de hexose anidra	T	mol de hexose anidra	T	ácido fórmico	
Original	0,94	0,92	0,41	0,46	2,2:1	2,0:1
Primeira	0,80	0,82	0,35	0,41	2,2:1	2,0:1
Segunda	0,60	0,70	0,27	0,35	2,2:1	2,0:1

E = dado experimental

T = dado teórico

BIBLIOGRAFIA

1. - HAMMARSTEN O., PFLUGER, Arch. Physiol., 36: 373, 1885.
2. - MAY F., Z. Biol. 92: 325-330, 1932.
3. - MAY F., Z. Biol. 92: 319-324, 1932.
4. - MAY F., Z. Biol. 95: 277, 1934.
5. - MAY F., Z. Biol. 95: 401, 1934.
6. - MAY F., Z. Biol. 95: 606, 1934.
7. - MAY F., Z. Biol. 95: 614, 1934.
8. - MAY F. and WEINLAND H., Z. Biol. 105: 339-347, 1953.
9. - WEINLAND H., Z. Biol. 324: 19-31, 1953.
10. - WEINLAND H., Biochem. Z. 324: 74-82, 1953.
11. - SCHLUBACH H. H. and LOOP W. Annalen. 532: 228, 1937.
12. - BALDWIN E. and BELL D.J., J. Chem. Soc. 1461-1465, 1938.
13. - BELL D. J. and BALDWIN E., J. Chem. Soc.
14. - O<sup>o</sup>COLLA P., Proc. R.I.A. sect. B. 5: 165-170, 1953.
15. - BARRY V. C., Nature Lond. 152: 537, 1943.
16. - CORREA J.B., DMYTRACZENKO A. and DUARTE J.H.  
Carbohydr. Res. 3: 445-452, 1967.
17. - DUARTE J.H. and JONES J.K.N. Carbohydr. Res. 16:  
327-335, 1971.
18. - DUARTE J. H., MORETTO M. I. and DIAZ S. Arquivos de  
Biol. e Tecnol. 14: 62, 1971.
19. - DUDMAN W. F. and BISHOP C.T. Can. J. Chem. 46:  
3079-3082, 1968.
20. - ASPINALL G.O. J. Chem. Soc. 1676-1680, 1963.
21. - STEPHEN A. M., KAPLAN M., TAYLOR G.L. and  
LEISEGANG E.C. Tetrahedron supplement. 7: 233-240, 1966.



22. - GUNNER S.W., JONES J.K.N. and PERRY M.B. Can. J. Chem.  
39: 1892-1899, 1961.
23. - SAWADEKER J.S., SLONEKER J.H. and JEANES A.  
Anal. Chem. 37: 1802, 1965.
24. - TREVFLYAN E.W., PROCTER D.P. and HARRISON J.S.  
Nature. 136: 444, 1950.
25. - WOLFROM M. L. and THOMPSON A. Methods Carbohyd.  
Chem. 2: 211-215, 1963.
26. - DUBOIS M. et al. Anal. Chem. 28: 350-356, 1956.
27. - GOLDSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A. and SMITH F.,  
Abstracts papers Am. Chem. Soc. 135: 3D., 1959.
28. - NEUMULLER G. and VASSEUR E. Arkiv Kemi. 5: 235, 1953.
29. - BARKER S.A., SOMERS P.J. Carbohyd. Res. 3: 220, 1967.
30. - ANDERSON D.M., GREENWOOD C.T. and HIRST E.L. J.  
Chem. Soc. , 225, 1955.
31. - HAY, G.W., LEWIS, B.A. and SMITH, F. Methods Carbohyd.  
Chem., 5: 377-380, 1965.
32. - GOLDSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A. and SMITH F.  
Methods Carbohyd. Chem. , 5: 361-370, 1965.
33. - HAY G.W., LEWIS B.A. and SMITH F., Methods Carbohyd.  
Chem., 5: 357-360, 1965.
34. - HIRST E.L. and PERCIVAL E. Methods Carbohyd. Chem.  
5: 287-296, 1965.
35. - NUNN J.R. and PAROLIS H. Carbohyd. Res. 14: 145-150, 1970.
36. - GOLDSTEIN, I.J., LEWIS, B.A. and SMITH, F. J. Am.  
Chem., 80: 939-941, 1956