

ELIANE DE ALMEIDA BORGES

ESTUDO ESTRUTURAL SOBRE GALACTANO ÁCIDO
ISOLADO DA GLÂNDULA DE ALBUMEN DE
AMPULLARIUS, sp. (Sto. Antônio da Platina)

CURITIBA
1977

ELIANE DE ALMEIDA BORGES

ESTUDO ESTRUTURAL SOBRE GALACTANO ÁCIDO
ISOLADO DA GLÂNDULA DE ALBUMEN DE *AMPUL-
LARIUS* sp. (Sto. Antonio da Platina)

TESE DE MESTRADO APRESENTADA AO DEPARTA-
MENTO DE BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ.

CURITIBA 1977.

TESE ORIENTADA PELO PROF. DR.
JOSÉ HAZENCLEVE DUARTE.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. João Batista Chaves Corrêa

Prof. Luiz Ramon Marechal

Prof. Sieg Odebrecht.

R E S U M O

Foi isolado um polissacarídeo ácido de glândula de albumen de *Ampullarius sp* (Santo Antonio da Platina) com auxílio de bases quaternárias. Este polímero é formado de unidades de D-galactose e ácido pirúvico numa relação molar de 20:1 (hexose anidra/grupo etilidenil). Não foi detectado grupo acetil e L-fucose neste polímero. Estes dados diferenciam estes polímeros daqueles investigados por outros autores em moluscos.

Í N D I C E

RESUMO	1
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	5
ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO	7
HIDRÓLISE ÁCIDA DO POLISSACARÍDEO PURIFICADO	9
ACETILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO HIDROLISADO	10
METILAÇÃO	10
METANÓLISE DO POLISSACARÍDEO METILADO	12
ACETILAÇÃO DOS DERIVADOS PARCIALMENTE METILADOS	12
OXIDAÇÃO POR PERIODATO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO POLISSACARÍDEO METILADO	13
CONSUMO DE PERIODATO E ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO	14
DEGRADAÇÃO TIPO SMITH DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
TABELA I	20
TABELA II	21
TABELA III	22
CONCLUSÃO	23
AGRADECIMENTOS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

I N T R O D U Ç Ã O

Hammarstein¹ demonstrou pela primeira vez a presença de um polissacarídeo em molusco, *Helix pomatia*, o qual diferia em suas propriedades biológicas daquelas do glicogênio. Apesar da notável contribuição de May²⁻⁸ na caracterização química deste polímero, os estudos estruturais propriamente ditos foram realmente iniciados em 1937 com o trabalho publicado por Schlubach e Loop⁹ os quais verificaram que o galactano metilado apresentava quantidades equimoleculares de di e tetra metil galactose. Estes derivados só foram identificados posteriormente, 1938, por Baldwin e Bell¹⁰ como sendo 2,4-di-0-metil - e 2,3,4,6-tetra - 0-metil-galactose. Baseados nestes dados de metilação, Baldwin e Bell propuseram duas possibilidades estruturais para o polímero: Uma cadeia linear formada de unidades de galactose com ligações do tipo (1—3) ou (1—6) com ramificações formadas por unidades simples de galactose nos carbonos C-6 ou C-3 da cadeia principal, já que ambos os modelos permitiam a formação dos derivados metilados anteriormente referidos. Estes autores, verificaram ainda a presença de unidades D e L numa proporção de 6:1 e que o tetra-0-metil galactose isolado era formado por uma mistura de isômeros D e L enquanto o derivado di-0-metil-galactose continha apenas o sómero D.

Os estudos em galactano de *Helix pomatia*, por O'Colla,¹⁵ em 1953 demonstraram que os resultados obtidos através de degradação de Barry eram incompatíveis com os modelos estruturais propostos por Baldwin e Bell.¹⁰ Os dados obtidos na degradação de

Barry juntamente com os dados de metilação^{10, 11} permitiam sugerir uma nova estrutura para este polímero. Seu modelo estrutural para o galactano, seria o de um polímero altamente ramificado (ramificação arboriforme) com ligações alternadas do tipo (1—3) e (1—6) apresentando a soma das unidades terminais não reductoras em quantidades equimoleculares a das unidades internas.

May e Weinland,¹³ também observaram que durante a hidrólise ácida deste polímero, a L-galactose era mais susceptível a hidrólise, que a D-galactose. A separação dos produtos de hidrólise ácida parcial do galactose demonstrou a presença de 3-0-β-D-galactosil-D-galactose e traços de 6-0-β-L-galactose. Os dados obtidos nestas investigações eram compatíveis com o modelo proposto por O'Colla.

Correa, Dimytraczenko e Duarte¹⁶ baseados nos dados de oxidação com periodato e degradação de Barry sugeriram para o galactano de *Biomphalaria glabrata* uma estrutura semelhante aquela proposta por O'Colla.

Os dados obtidos em estudos de metilação do galactano da glândula de albúmen do *Strophocheilus Oblongus*, por Duarte e Jones,¹⁷ não se ajustavam ao modelo proposto por O'Colla. Recentemente, Duarte e Segura,¹⁸ através de estudos de degradação sequenciada tipo Smith, puderam propor um novo modelo estrutural para o galactano de *Strophocheilus Oblongus*, modelo este que se ajustava perfeitamente aos resultados de metilação obtidos por Duarte e Jones.¹⁷ Duarte e Moretto¹⁹ obtiveram semelhantes resultados

de metilação para o galactano de *Biomphalaria glabrata*.

Por hidrólise ácida parcial, Honda²⁰ caracterizou duas séries distintas de oligossacarídeos do galactano de glândula de albúmen de *Megalobolinus paranaquensis*: uma, linear do tipo (1—3) e outra, ramificada, formada por uma cadeia linear do tipo β (1—3), com pontos de ramificação do tipo β (1—6). Estes dados, juntamente com estudos sobre os galactosídeos de glicerol obtidos da segunda degradação sequenciada, tipo Smith, em polímero do mesmo molusco²¹ mostraram também resultados compatíveis com o modelo proposto por Duarte e Segura.

Feijó e Duarte²² isolaram de massas de ovos de *Ampullarius*, sp um heteropolissacarídeo que apresentava características químicas diferentes dos polímeros até então estudados. O polímero foi denominado de fuco-galactano, apresentando uma relação de 2,5% de fucoose para 98% de galactose.

Posteriormente, Duarte²³ verificou que o galactano isolado da glândula de albúmen de *Marisa cornuarietis* apresentava características semelhantes ao polímero do *Ampullarius*, sp, deixando supor que, com a continuidade dos estudos, poderia ser determinado um modelo estrutural aplicado a todos os galactanos de *Ampullarídeos*. Recentemente, Duarte²⁴ trouxe uma contribuição notável neste campo, pela primeira vez, foi descrito um galactano ácido, altamente acetilado.

Os dados até agora obtidos em estudos estruturais sobre galactano de *Ampullarius*, sp não permitem estabelecer um mo-

delo estrutural para este polímero. A finalidade do presente trabalho é contribuir para o esclarecimento da estrutura do galactano deste molusco e verificar se o galactano dos moluscos do gênero *Ampullarius* coletados em diferentes regiões do Brasil, apresentam diferenças estruturais que possibilitem uma classificação taxionômica quanto às espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

A análise por eletroforese foi realizada em papel acetilado (cellogel) segundo método de Dudman e Bishop²⁹ em aparelho Famen e câmara de imersão da chemetron.

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de alumínio cobertas com 0,25 mm de sílica gel (Merck) nos seguintes sistemas de solventes (v/v): (a) 6:3:3 benzeno: acetato de etila: metanol; (b) 200:47:15:1 (fase superior) benzeno: etanol: água: ácido acético; (c) 3:3:1 acetato de etila: éter de petróleo: clorofórmio. Os açúcares cromatografados em placa foram visualizados com: (d) ácido sulfúrico a 5% (v/v) em metanol; (e) molibdato de amônia 0,5%, sulfato de cério 0,5%, ácido sulfúrico 5%, em etanol, seguido de aquecimento em mufla a 200° C.

Para cromatografia em papel (Wathman nº 1 e 4) tipo descendente foram utilizados os sistemas de solventes (v/v): (f) 1:5:3:3 (fase superior) benzeno: n-butanol: piridina: água; (g) 9:3:3 n-butanol: etanol: água; (h) 4:1:5 n-butanol: etanol: água; (i) 1:4:5 ácido acético: n-butanol: água; (j) 20:1:17 butanona: amônia: água. A visualização dos açúcares foi feita com nitrato de prata alcalino²⁵ ou com cloridrato de p-anisidina²⁶. A migração dos açúcares redutores e metil-galactosídeos foi relacionada a da D-galactose (Rgal) e a do 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucosídeo (Rg) respectivamente.

Cromatografia em fase gasosa (GLC) realizada em cromatôgrafo F&M modelo 810 R-12 com detector de ionização de chama, utilizando hélio como gás de arraste (fluxo de 40 ml/min). Foram utilizadas as seguintes colunas: (k) 14% (p/p) LAC-4R-886 - sobre Chromosorb W (DMSC)²⁷ de 80 a 100 mesh (Cromatographic Specialities, Brockville Canadá) em coluna de 100 x 0,4 cm (d.i) e a temperatura de 158°C; (l) 3% (p/p) de ECNSS-M sobre Gás Chrom. Q²⁸ (Applied Science Laboratories, State College, P.A. U.S.A.) de 100-120 mesh em coluna de 120 x 0,3 cm (d.i) utilizada em dois sistemas de análise: (I) isotérmico a 175°C e (II) temperatura programada de 130 a 165°C com variação de 4°C/min. em todos os experimentos as temperaturas da câmara de injeção e do detector foram mantidas em 210 e 250°C respectivamente. Os alditois acetilados de derivados parcialmente metilado foram analisados por GLC a temperatura de 160°C. Nas análises quantitativas de derivados de açúcares, por GLC, as áreas dos picos foram calculadas por triangulação. Os tempos de retenção (T) dos metil galactosídeos metilados foram referidos ao metil 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucopiranosídeo, enquanto os (T) dos alditois acetilados e dos alditois acetilados de derivados parcialmente metilados foram relativos ao do L-arabinitol-penta-acetato e ao do 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol respectivamente.

As rotações óticas foram medidas a 25°C em polarímetro PERKIM-ELMER modelo 141.

A determinação de açúcar total, foi feita pelo método do fenol-ácido sulfúrico³⁸ e a dos açúcares redutores pelo método

de Somogyi iodométrico.³⁰ Proteínas foram dosadas pelo método descrito por Lowry³¹ usando o reativo de Folin-Ciocalteu. Hexosaminas foram determinadas pelo método de Boas,³² e o grupo acetil pelo método de McComb e McCready.³⁵ O processo utilizado para acetilação dos açúcares foi o método clássico do anidrido acético-piridina 1:1 (v/v),³⁹ 4 horas em refluxo a 100°C. A hidrólise total do polissacarídeo foi feita em ampola fechada, utilizando-se ácido sulfúrico 1N a 100°C durante 4 horas. O excesso de ácido foi eliminado por precipitação com carbonato de bário (pH 4,5), seguido de centrifugação e posteriormente deionização do sobrenadante.

Após determinação química³⁴ e enzimática³³ do ácido pirúvico ligado ao polissacarídeo. Uma amostra de polímero purificado (10mg) foi hidrolizada com ácido sulfúrico 1N (3 horas, 100°C) e cromatografada em papel Wathman nº 1 usando como solvente a solução (v/v) 95:5 de n-butanol saturado com água: ácido fórmico.⁵⁶ O ácido pirúvico foi visualizado no cromatograma através do reativo de Nessler.⁵⁷

2 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO

As glândulas de albúmen utilizadas neste trabalho, foram extraídas de moluscos (*Ampullarius, sp.*) colhidos em Santo Antônio da Platina, Pr., em julho de 1974 e conservadas em acetona.

As glândulas foram homogeneizadas em liquidificador e centrifugadas e o resíduo obtido foi desidratado com acetona anidra. O pó cetônico obtido (75g) foi tratado com a mistura de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v) a temperatura ambiente, sob agitação magnética, durante 60 horas e a 40°C, em refluxo por 1 hora, após centrifugação o resíduo foi tratado com n-butanol saturado com água, em refluxo a 90°C, durante 1 hora. Após filtração, o resíduo obtido foi desidratado com acetona anidra e o pó cetônico resultante pesou 71,40g.

A amostra foi em seguida tratada com ácido acético 2N a 4°C e dializada. O material não dialisável, foi tratado com etanol (3 volumes) e centrifugado. O resíduo, foi lavado com acetona anidra e o pó cetônico obtido pesou 30g.

O pó cetônico (30g) foi submetido a ação de enzima proteolítica (Subtilisina, tipo VII, Sigma - 100mg) em solução de acetato de amônia 0,2 M, pH 8,5 (500 ml), contendo toluol (10ml) e cloreto de cálcio na concentração final de 0,005 M. A suspensão foi mantida a 37°C durante 75 horas e em seguida dialisada em água corrente. O material não dialisável foi tratado com etanol (3 volumes) e centrifugado. O resíduo obtido foi solubilizado em água (50 ml) e a solução aquosa foi tratada com fenol a 80% numa proporção de 5:1 (v/v) e em seguida centrifugada. A porção fenólica (fase inferior) foi desprezada e o sobrenadante (fase superior) tratado com etanol (3 volumes). Após centrifugação, o resíduo foi submetido ao processo de Sevag³⁶ e a fração aquosa (epifase) foi tratada com etanol (3 volumes) e novamente centri

fugada. O resíduo obtido foi tratado com acetona anidra, seco em dessecador a vácuo, contendo pentóxido de fósforo, apresentando um rendimento de 4,76% (3,21g-expresso em polissacarídeo) o qual foi dosado pelo método de fenol-ácido sulfúrico.³⁸

O polissacarídeo purificado (3,21g) foi submetido ao processo de fracionamento, utilizando-se base quaternária de amônia (brometo de hexadeciltimetilamônio - Sigma), em presença de tampão borato a diferentes pH, segundo método descrito por Duarte e Jones.¹⁷ A fração isolada a pH 8,5, foi liofilizada e pesou 1,9g, sendo submetida a estudos estruturais. Estes polímeros de difícil solubilidade em meio aquoso foram solubilizados, quando tratados com hidróxido de sódio 0,1N durante 3 horas e a 60°C.

3 - HIDRÓLISE ÁCIDA DO POLISSACARÍDEO PURIFICADO³⁷

Uma amostra do polissacarídeo (10 mg) foi hidrolisada com ácido sulfúrico 1N (1 ml) durante 4 horas a temperatura de 100°C. A solução ácida foi neutralizada com carbonato de bário (pH 4,5), centrifugada e o sobrenadante deionizado com resinas Dowex 50 x 12 forma H⁺ (200 - 400 mesh) e Amberlite IR-4B, forma OH⁻ (25-50 mesh). Os produtos de hidrólise, foram analisados por cromatografia em papel (solvente d) e visualizados com p-anisidina²⁶ e nitrato de prata alcalino,²⁵ revelando apenas D-galactose. A rotação ótica observada foi de $[\alpha]_D^{25} = + 78,0^{\circ}$ (c. 0,4 água).

4 - ACETILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO HIDROLISADO

Uma amostra do polissacarídeo (10 mg), após hidrólise ácida foi reduzida com boridreto de sódio em solução aquosa e a temperatura ambiente por 12 horas. Após neutralização (pH 7,0) com ácido acético 2N, a solução foi tratada com resina Dowex 50 x 12 (200-400 mesh) forma H^+ e o eluato concentrado a pressão reduzida, o ácido bórico residual foi removido por codestilação com metanol anidro. Os alditois resultantes foram acetilados com uma mistura de piridina e anídrido acético 1:1 (v/v) durante 15 horas a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água a $0^{\circ}C$, e o material acetilado foi extraído com clorofórmio e concentrado. Analisado em GLC (coluna L) demonstrou apenas galactitol como componente único do polímero, confirmando o que já fora observado em cromatografia em papel.

5 - METILAÇÃO

5-1- PROCESSO DE HAWORTH⁴⁰

Uma amostra do polissacarídeo purificado (1 g), após redução com boridreto de sódio foi dissolvida em água (10 ml) tratada com acetona (10 ml), hidróxido de sódio a 40% (20 ml) e dimetil sulfato (10 ml) os quais foram acrescentados gota a gota sob agitação magnética, durante 4 horas e a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi neutralizada com ácido sulfúrico 6N (pH 7,0) a $0^{\circ}C$, dializada em água corrente durante 24 horas e finalmente concentrada a vácuo e liofilisada. Esse pro-

cesso de metilação foi repetido por mais 3 vezes nessa amostra.

5-2 - PROCESSO MODIFICADO DE HAWORTH⁴¹

O polissacarídeo parcialmente metilado, foi dissolvido em tetrahidrofurano (50 ml) e tratado com hidróxido de sódio pulverizado (10 g) e dimetil sulfato (12 ml) acrescentado gota a gota durante 4 horas. A reação foi realizada a temperatura ambiente e sob agitação magnética durante 16 horas. Em seguida, o solvente foi evaporado a vácuo e o resíduo solubilizado em água foi neutralizado com ácido sulfúrico 6N (pH 7,0) e (0 - 2,0°C). Após diálise em água corrente a solução contendo polissacarídeo parcialmente metilado foi liofilizada. Esse processo de metilação foi repetido e o polissacarídeo metilado foi novamente liofilizado, apresentando um rendimento de 87,2%.

5-3 - PROCESSO DE HAKOMORI - MODIFICADO SEGUNDO SANDFORD E CONRAD⁴²

O polissacarídeo parcialmente metilado, foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO). Após acrescentar 0,023 eq. de anion metilsulfinil, a mistura reagente foi deixada durante 8 horas sob agitação magnética. Em seguida, foi adicionado ao sistema, iodeto de metila (10 ml) sendo a reação interrompida após 20 min. por neutralização com ácido sulfúrico 6N (pH 7,0)(0-2°C). Após diálise em água corrente e liofilização, o processo foi repetido por mais 3 vezes. Todas as etapas do processo foram feitas sob atmosfera de nitrogênio e a temperatura de aproximada-

mente 20°C. Após esse processo de metilação, o polímero metilado apresentou um rendimento de 77%.

6 - METANÓLISE DO POLISSACARÍDEO METILADO

Uma amostra (10 mg) do polissacarídeo metilado, foi tratada com ácido clorídrico a 5% em metanol (1 ml), durante 4 horas a 100°C, em ampola fechada. Após neutralização com carbonato de prata (pH 7,0) a solução foi centrifugada e o sobrenadante submetido a tratamento com gás sulfídrico. Os sais de prata precipitados, foram eliminados por filtração e o filtrado obtido foi concentrado a vácuo. A mistura de metil galactosídeos parcialmente metilados foi dissolvida em clorofórmio e analisadas em G.L.C. (coluna K) e T.L.C. (solvente d). Uma alíquota do material metanolisado, foi hidrolisada com ácido clorídrico 0,5 N durante 3 horas, neutralizada com carbonato de prata (pH 7,0) centrifugada e o sobrenadante concentrado a vácuo. Os derivados metilados (forma redutora) assim obtidos, foram analisados por cromatografia em papel (solvente g-j) e visualizados com p-anisidina.

7 - ACETILAÇÃO DOS DERIVADOS PARCIALMENTE METILADOS

O polímero metilado (10 mg) foi hidrolizado com ácido fórmico a 90% (1 ml) em ampola fechada e a temperatura de 100°C por 1 hora. A solução ácida foi em seguida concentrada à pressão reduzida a fim de eliminar o excesso de ácido fórmico e em seguida submetida a hidrólise com ácido sulfúrico 0,5 N, a 100°C

durante 14 horas. O hidrolizado foi neutralizado com carbonato de bário (pH 4,5) e centrifugado. O sobrenadante foi deionizado com resina catiônica Dowex 50 x 12, forma H^+ , reduzido com bórax e metanol e em seguida acetilados. Os alditois acetilados parcialmente metilados, foram analisados por G.L.C.⁴⁴⁻⁴⁵ e cromatografia em camada delgada (solvente e) sendo visualizadas com a solução de molibdato de amônia, sulfato de cério, ácido sulfúrico e etanol.

8 - OXIDAÇÃO POR PERIODATO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO POLISSACARÍDEO METILADO

Uma amostra do polímero metilado, foi hidrolisada pelo método descrito por Bouveng⁴³ et al e em seguida submetida a oxidação por m-periodato de sódio (0,005 M), na ausência de luz e a temperatura ambiente durante 4 horas. Após este período, o excesso de periodato foi eliminado por adição de inositol à solução oxidante. Em seguida, a solução foi deionizada através de resinas trocadoras de íons, Dowex 50 x 12, 200-400 mesh, forma H^+ e Dowex 2 x 8, 200-400 mesh, forma acetato.

Os açúcares parcialmente metilados contidos nos eluatos, foram extraídos com clorofórmio e a solução clorofórmica concentrada à pressão reduzida e a temperatura de 35°C. Uma alíquota do resíduo obtido foi acetilada e os alditois acetilados de derivados parcialmente metilados foram extraídos com clorofórmio e analisados em GLC (coluna 1).

A outra fração do produto de oxidação por periodato, foi submetida ao processo de glicosidação de Fischer. A amostra foi tratada com ácido clorídrico a 2% em metanol, durante 4 horas a 100°C, em ampola fechada. A solução ácida foi em seguida neutralizada com carbonato de prata (pH 7,0), filtrada e o filtrado concentrado a pressão reduzida e a 35°C. O resíduo contendo a mistura de metil glicosídeos parcialmente metilados foi dissolvida em clorofórmio e analisada em GLC (coluna k).

9 - CONSUMO DE PERIODATO E ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO

Uma amostra (50 mg) do polissacarídeo original foi submetida a oxidação com m-periodato de sódio (0,04 M, 25 ml) na ausência de luz, durante 90 horas e a temperatura de 2-4°C. Em diferentes intervalos de tempo, foram retiradas alíquotas (1,0 ml) da mistura oxidante e determinado o consumo de periodato.⁴⁶

Do gráfico obtido, expresso em mol do periodato/mol de hexose anidra contra tempo, foi extrapolado o valor do consumo de periodato para o tempo zero.

O ácido fórmico liberado na oxidação do polissacarídeo, foi determinado por titulação com hidróxido de sódio 0,01 N sob atmosfera de nitrogênio usando fenolftaleína como indicador.⁴⁷

a) Cálculo do consumo de periodato:

Molaridade da solução oxidante = X

$$X = \frac{(B - A) \cdot N \text{ do tiosulfato de sódio}}{\text{ml da alíquota} \cdot 2}$$

$$\frac{\text{moles de periodato}}{\text{ml de hexose anidra}} = \frac{\text{volume total da solução oxidante} \cdot 162}{\text{g do polissacarídeo} \cdot 103}$$

b) Cálculo do ácido fórmico liberado:

$$Y = \frac{\text{moles de ácido fórmico liberado}}{\text{mol de hexose anidra}}$$

$$Y = \frac{\text{ml de NaOH} \cdot N \text{ da solução de NaOH} \cdot \text{vol. da solução oxid.} \cdot 162}{\text{g do polissacarídeo} \cdot 1000}$$

10 - DEGRADAÇÃO TIPO SMITH DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL

A uma alíquota oxidada com m-periodato de sódio como descrito anteriormente, foi adicionado 1 ml de etileno glicol, para eliminar o excesso de periodato; após 30 minutos, a solução foi submetida a diálise em água corrente por 24 horas, concentrada a vácuo e reduzida com boridreto de sódio. O polímero reduzido, foi hidrolisado com ácido sulfúrico 1.N. durante 4 horas a 100°C. O material hidrolisado, foi reduzido com boridreto de sódio, neutralizado, deionizado com resina trocadora de íons e acetilado com a mistura de piridina: anidrido acético 1:1 (v/v). Os alditois acetilados obtidos, foram analisados por GLC (coluna 1) e por cromatografia em camada delgada (solvente e) usando a solução metanol: ácido sulfúrico a 5% (v/v) como revelador dos açúcares acetilados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O polissacarídeo isolado da glândula de albúmen foi purificado por precipitação fracionada com base quaternária de amônia em pH 8,5 e apresentou em sua composição química D-galactose (96,99%), ácido pirúvico (2,11%) e vestígios de proteína (0,9%). Foi isolada também uma fração de polissacarídeo ácido em pH 7,0 (pouco abundante) a qual não foi estudada no presente trabalho.

O polissacarídeo por hidrólise ácida apresentou rotação óptica de $[\alpha]_D^{25} = + 78,0^{\circ}$ (c 0,4 água) indicando ser o polímero formado por unidades de D-galactose.

As unidades de D-galactose e ácido pirúvico presentes no polissacarídeo apresentaram uma relação aproximada de 46:1 (calculada em g de polissacarídeo/ g de ácido pirúvico) equivalentes à relação molar de 20:1 (hexose anidra/grupo carboxililidenil).

A difícil solubilidade de galactano em meio aquoso impediu seu fracionamento em colunas de DEAE Sephadex A-50 e Sepharose 6- β -100 bem como a determinação de sua rotação ótica. Entretanto, na análise por eletroforese em papel acetilado, o polímero mostrou-se indissociável, demonstrando ser uma amostra homogênea e suficientemente adequada aos estudos estruturais.

A presença de ácido pirúvico ligado ao galactano já havia sido observada em microorganismos⁴⁸⁻⁵⁶, porém, só recentemente foi descrita sua presença em moluscos²⁴, sendo que sua função bio

lógica ainda é desconhecida. Duarte²⁴, isolou duas frações de polissacarídeos ácidos da glândula de albúmen de *Ampullarius sp* - (Recife) contendo D-galactose, ácido pirúvico e grupo acetil numa relação de 17:1:4, enquanto no polissacarídeo ácido, ora investigado, não foi detectado a presença do grupo acetil.

Pela hidrólise ácida do polímero isolado, obteve-se apenas D-galactose $[\alpha]_D^{25} + 78,0^{\circ}$, quando analisado em cromatografia em papel (solvente f) e dulcitol hexa-acetilado quando analisado em GLC.

A oxidação do galactano por periodato, mostra um consumo de 1,0 mol de m-periodato de sódio e a liberação de 0,43 moles de ácido fórmico por mol de hexose anidra.

Estes dados concordam bem com os resultados obtidos da degradação de Smith (tabela I) e com os de metilação (tabela II).

O derivado metilado 3,4,6-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo não foi detectado na coluna (k) em virtude de estar sobreposto ao derivado 2,4,6-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo. Entretanto, sua porcentagem molar foi obtida, calculando-se a área do cromatograma (GLC) correspondente ao 2,4,6 e 3,4,6-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo, relativa ao 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactopiranosídeo, nos polissacarídeos antes e após oxidação com m-periodato de sódio. A redução de área obtida no polímero metilado, que foi submetido previamente à hidrólise ácida e subsequente oxidação com periodato, foi atribuída à oxidação do derivado mais provável (3,4,6-tri-0-metil-D-galactopiranosose). Este

composto metilado foi posteriormente identificado por GLC na forma de alditol acetilado (Tabela III, T = 2,5). Feijó²² encontrou T = 2,5 para o mesmo derivado. Correlacionado com este aspecto, os dados da tabela II demonstraram que houve oxidação de um dos componentes da mistura de açúcar analisados por GLC, o que explicaria a origem do composto X com T = 0,9 (provavelmente 2,3,5-tri-0-metil-D-lixofuranosídeo). Feijó²² obteve T = 0,7 para este composto. Esta pentose metilada é o composto resultante da oxidação com m-periodato de sódio dos grupos 1,2 diol (C1 e C2) do derivado 3,4,6-tri-0-metil-D-galactopiranoose.

O derivado 2,6-di-0-metil-D-galactopiranosídeo observado nos produtos de metilação (Tabela II) não foi detectado na coluna (1) na forma de alditol acetilado e parcialmente metilado, por se encontrar superposto na área do 1,5,6-tri-0-acetil-2,3,4-tri-0-metil-D-galactitol. Este derivado foi melhor identificado em GLC, em coluna de OV-225.

Os derivados metilados 2,6-di-0-metil-D-galactopiranosídeo e 2,3,6-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo poderiam ser considerados como prováveis produtos de metilação incompleta do polímero. Nas investigações realizadas em galactano de *Ampullarius* sp (Recife), Duarte²⁴ após sucessivas metilações (13 processos) - neste polímero, encontrou uma proporção de 5,4 moles % de 2,6-di-0-metil-D-galactopiranosídeo. Baseados nestes dados, na análise de I.V. do polímero, bem como na ausência de 1,3-0-(1-carboxietilideno-eritritol) ou eritritol livre nos produtos de hidrólise do polímero oxidado e reduzido, Duarte²⁴ sugeriu que o áci

do pirúvico estivesse formando cetal com unidades de D-galactose envolvendo os carbonos C-3 e C-4. Esta sugestão justificaria a presença do 2,6-di-O-metil-D-galactopiranosídeo como produto de metanólise do polissacarídeo metilado.

Os dados estruturais do polissacarídeo ácido do *Ampullarius* sp (Santo Antonio da Platina, Pr.) são semelhantes àquelas obtidos por Duarte em *Ampullarius* sp (Recife), entretanto a ausência do grupo acetil e de L-fucose no polímero ora investigado, diferencia-o daqueles investigados por Duarte²⁴ e Feijó.²² - Deste modo a análise estrutural de polissacarídeo de glândula de albúmen de moluscos do gênero *Ampullarius* poderá trazer uma contribuição para a classificação taxionômica quanto às espécies de moluscos deste gênero conforme a proposição deste trabalho.

TABELA I

Análise por GLC dos produtos de degradação de
Smith do polissacarídeo original.

ALDITOIS ACETILADOS	(T)	Moles % obtidos
Glicerol tri-acetilado	0,18	41
Dulcitol hexa-acetilado	0,50	59

(T) = Relativo ao L-arabinitol penta-acetilado. (coluna 1)

TABELA II

Análise por GLC de metil-D-glicosídeos metilados do polímero metilado.

DERIVADOS METILADOS	(T) Moles %		
	P1	P2	P1
metil 2,3,4,6-tetra- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactopiranosídeo	2,0 f	2,0 f	39,0
metil 2,3,6-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactopiranosídeo	4,0	4,0	1,1
metil 2,4,6-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactopiranosídeo	5,1m 6,1f	6,2 f	6,8
metil 3,4,6-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactopiranosídeo	—	—	4,2 ^a
metil 2,3,4-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactopiranosídeo	10,0 m	10,0 m	3,6
metil 2,6-di- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactopiranosídeo	14,0 f	—	6,7
metil 2,4-di- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactopiranosídeo	24,6m 30,0f	26,0 m	38,7
composto X	—	0,9	—

(T) = Relativo ao metil 2,3,4,6-tetra-0-metil- β -D-glucopiranosídeo (coluna k).

P1 = Derivados metilados obtidos após metanólise do polissacarídeo metilado.

P2 = Derivados obtidos após hidrólise ácida seguida de oxidação com m-periodato de sódio e glicosidação de Fischer.

a = A percentagem molar deste derivado foi calculada após oxidação com m-periodato de sódio dos produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado.

f = forte

m = médio

TABELA III

Análise por GLC^a dos alditois acetilados e parcialmente metilados.

DERIVADOS	(T)	
	P1	P2
1,5-di- <u>0</u> -acetil-2,3,4,6-tetra- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	1,20	1,30
1,3,5-tri- <u>0</u> -acetil-2,4,6-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	2,30	2,23
1,2,5-tri- <u>0</u> -acetil-3,4,6-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	2,50	—
1,5,6-tri- <u>0</u> -acetil-2,3,4-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	3,42	3,41
1,3,4,5-tetra- <u>0</u> -acetil-2,6-di- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	— a	—
1,3,5,6-tetra- <u>0</u> -acetil-2,4-di- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	6,35	6,35

(T) = Referido ao 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol (coluna 1)

a = Derivados identificados em coluna OV 225.

P1 = Derivados sintetizados a partir dos produtos de hidrólise de polisacarídeo metilado.

P2 = Derivados sintetizados a partir dos produtos de hidrólise do polisacarídeo metilado (oxidado com m-periodato de sódio).

CONCLUSÃO

A ausência de grupo acetil e L-fucose no polissacarídeo de *Ampullarius sp* (Santo Antonio da Platina) demonstra uma diferença estrutural em relação aos demais galactanos de moluscos do gênero *Ampullarius* já investigados.

AGRADECIMENTOS

Ao Orientador da Tese, Dr. José Hazencleve Duarte; à Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Dra. Glaci Theresinha Zancan; ao Professor J.K.N. Jones (Departamento de Química da Universidade de Kingston/Ontário, Canadá); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Projeto nº 5216/76) e (7945/75-SIP/08-106); ao BNDE/FUNTEC (Projeto nº 158); ao Professor José Norberto Callegari Lopes da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto/USP (pelas análises de I.V.).

B I B L I O G R A F I A

- 1 - HAMMARSTEIN, O. Studien Über mucin un mucinähnliche substanzen.
Pfluger, Arch, Physiol., 36: 373-455, 1885.
- 2 - MAY, F. Beitragzur des tierischen. Z. Biol., 91:215-220, 1931.
- 3 - MAY, F. Beitragzur kenntnis des Glykogen und Galaktogengehaltes
(tierisches Siniatrin) bei Helix pomatia. Z.F.Biol. 92: 319-324,
1932.
- 4 - MAY, F. Über den Galaktogengehalt der Eier von Helix pomatia.Z.F.Biol.,
92: 325-330, 1932.
- 5 - MAY, F. Chemische un biologische Untersuchungen Über Galaktogen.
Z.F.Biol., 95: 277-297, 1934.
- 6 - MAY, F. Chemische un biologische Untersuchungen Über Galaktogen.
Z.F.Biol., 95: 401-430, 1934.
- 7 - MAY, F. Chemische un biologische Untersuchungen Über Galaktogen.
Z.F.Biol., 95: 606-613, 1934.
- 8 - MAY, F. Chemische Untersuchungen Über Galaktogen. Z.F.Biol., 95: 614-
634, 1934.
- 9 - SCHLUBACH, N.H. and LOOP, W. Méthylation of Galactogen isolated from
the whole bodies of snails. Annalen, 532: 228, 1937.
- 10 - BALDWIN, E. and BELL, D. J. A preliminary investigation of Galactogen
from the albumin-glands of Helix pomatia. J. Chem. Soc. 1461-1465;
1938.
- 11 - BELL, D. J. and BALDWIN, E. The chemistry of Galactogen from Helix
pomatia. L-Galactose as a component of a polysaccharide of animal
origin. J.Chem.Soc., 125-131, 1941.

- 12 - MAY, F. und WEINLAND, H. Darstellung von L-Galaktose aus Galaktogen. Z. Physiol. Chem., 296: 154-156, 1954.
- 13 - MAY, F. und WEINLAND, H. Beobachtungen bei der Säurehydrolyse des Galaktogens. Z. Physiol. Chem., 305: 75-86, 1956.
- 14 - WEINLAND, H. Beobachtungen bei der Saurehydrolyse des Galaktogens. Z. Physiol. Chem., 305: 87-96, 1956.
- 15 - O'COLLA, P. The application of the Barry degradation to snail Galactogen. Proc. R. I. A. Sect. B., 55: 165-170, 1953.
- 16 - CORREA, J. B. C., DMYTRACZENKO, A., and DUARTE, J.H. Structure of a galactogen found in albumen glands of Biomphalaria glabrata. Carbohyd. Res., 3: 445-452, 1967.
- 17 - DUARTE, J. H. and JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail Strophocheilus oblongus. Carbohy. Res., 16: 327-335, 1971.
- 18 - SEGURA, E.A.D. Estudo de metilação em galactano de Strophocheilus oblongus após degradação sequenciada de Smith. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da UFPr., 1972.
- 19 - DUARTE, J.H. e MORETTO, M.I. Estudos estruturais em galactano de Biomphalaria glabrata. Ciência e Cultura, 1972.
- 20 - HONDA, N.K. Estudo dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial do galactano isolado da glândula de albúmen de Megalobulinus paranaquensis. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da UFPr., 1973.

- 21 - IACOMINI, M. Estudos estruturais de galactosídeos de glicerol obtidos da segunda degradação sequenciada tipo Smith do galactano de Megalobulinus paranaquensis. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da UFPr., 1975.
- 22 - FEIJÓ, M.A.L. and DUARTE, J.H. Some structural studies on the fucogalactan from egg masses of the snail Ampullarius sp. Carbohy. Res., 44: 241-249, 1975.
- 23 - DUARTE, J.H. Estudos estruturais de galactano de glândula de albúmen de Marisa cornuarietis. Ciência e Cultura (in press).
- 24 - DUARTE, H.S. Alguns aspectos estruturais do polissacarídeo da glândula de albúmen de Ampullarius sp. (Recife). Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da UFPr., 1976.
- 25 - TREVELYAN, W. E., PROCTER, D.P. and HARRISSON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by the use of dipping reagents. Nature, 166: 444-445, 1950.
- 26 - JONES, J.K.N. and WALTMAN, W.H. Quantitative analyses of mixtures of sugars by the methods of partition chromatography. Part V: Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatography. J.Chem.Soc., 1702-1706, 1950.
- 27 - STEPHEN, A.M., KAPLAN, M., TAYLOR, G.L. and LEISEGAN, E.C. Application of gas-liquid chromatography to the structural investigation of polysaccharides. Tetrahedron Supplement., 7: 223-240, 1966.

- 28 - SAWARDERKER, J.S., SLONERKER, J.H. and JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas chromatography. Anal. Chemistry., 37: 1602-1604, 1965.
- 29 - DUDMAN, W. F. and BISHOP, C.T. Electrophoresis of dried polysaccharides on cellulose acetate, Can. J. Chem., 46: 3079-3084, 1968.
- 30 - SOMOGYI, M. Notes on sugars determination. J. Biol. Chem., 195: 19-23, 1952.
- 31 - LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- 32 - BOAS, N. F. Method for the determination of hexosamines in tissues. J. Biol. Chem., 204: 553-563, 1953.
- 33 - DUCKWORTH, J.H. YAPHE, W. Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides. Chem. Industry., 6: 747-748, 1970.
- 34 - SLOKENER, J.H. and ORENTAS, D.G. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. Nature, 194: 478-479, 1962.
- 35 - McCOMB, E.A., and McCREADY, C.M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Anal. Chem., 29: 819-821, 1957.
- 36 - SEVAG, M. B. Biochem. Z., 273: 419-429, 1934.
- 37 - FOSTER, A.B., and OVEREND, W.G. The acidic hydrolysis of O-glycosides. Chem. Ind., (London) 566-567, 1955.
- 38 - DUBOIS, M., GILLES, K.A., J.K. ROBERS, P.A., and SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356, 1952.

- 39 - WOLFROM, M.L., and THOMPSON, A. Acetylation. Meth. Carbohyd. Chem. 11: 211-215, 1963.
- 40 - HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107: 8-16, 1915.
- 41 - HIRST, A., and PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. Meth. Carbohyd. Chem. 5: 287-298, 1965.
- 42 - SANDFORD, P.A., and CONRAD, H.E. The structure of the aerobacter aerogenes A₃ polysaccharides I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. Biochem. 5: 1508-1516, 1966.
- 43 - BOUVENG, H. and LINDBERG, B. Hydrolysis of methylated polysaccharides. Meth. Carbohyd. Chem. 5: 296-297, 1965.
- 44 - BJORDAL, H., HELLERQVIST, C.G., LINDBERG, B. and SVENSSON, S. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 9: 610-619, 1970.
- 45 - BJORDAL, H., LINDBERG, B., and SVENSSON, S. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols. Acta Chem. Scand., 21: 1801-1804, 1967.
- 46 - NEUMULLER, G., and VASSEUR, E. The influence of pH periodate oxidation of carbohydrates. Arkiv. for Kemi., 5: 235-245, 1952.
- 47 - ANDERSON, S.A., GREENWOOD, C.T., and HIRST, E.L. Physicochemical studies on starches. Part II - The oxidation of starches by potassium metaperiodate. J. Chem. Soc., 225-231, 1955.

- 48 - WHEAT, R.W., DORSCH, C., and GODOY, G. Occurrence of pyruvic acid in the capsular polysaccharide of Klebsiella-rhinoscleromatis. J. Bacteriology. 89-539, 1965.
- 49 - GORIN, P.A., and ISHIKAWA, T. Configuration of pyruvic acid ketals, 4,6-0-linked to D-galactose units in bacterial and algal polysaccharides. Can. J. Chem. 45: 521-532, 1967.
- 50 - GORIN, P.A., ISHIKAWA, T., SPENCER, J.F.T., and SLONEKER, J.H. Configuration of the pyruvic acid ketals linked to D-glucose units, in Xanthomonas campestris polysaccharides. Can. J. Chem., 45: 2005-2008, 1967.
- 51 - ORENTAS, D.G., SLONEKER, J.H., and JEANES, A. Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus Xanthomonas. J. Microbiology., 9: 427-430, 1963.
- 52 - COOKE, A., and PERCIVAL, E. Structural investigations of the extracellular polysaccharides elaborated by Beijerinckia mobilis. Carboh. Res., 43: 117-132, 1975.
- 53 - DUTTON, G.G.S. Structural investigation of Klebsiella serotype K7 polysaccharide. Carboh. Res., 38: 225-237, 1974.
- 54 - DUDMAN, W.F. The extracellular polysaccharides of Rhizobium japonicum compositional studies. Carboh. Res., 46: 97-110, 1976.
- 55 - MELTON, L.D., MINDT, L., REES, D.A., and SANDERSON, G.R. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris: Evidence from partial hydrolysis studies. Carboh. Res. 46: 245-257, 1976.

56 - MAGASANIK, B. The separation and identification of ketoacids By Filter paper Chromatography, J. Am. Chem. Soc., 72: 2308-2309, 1950.

57 - LIBERMAN, L.A., ZAFFARONI, A., and STOTZ, E. Paper chromatography of hydroxy and ketoacid, J. Am. Chem. Soc., 73: 1378-1388, 1951.