

Marco Aurélio Lacombe Feijó

ESTUDO SOBRE A ESTRUTURA E A BIODEGRADAÇÃO DOS
POLISSACARÍDEOS COMPONENTES DA MASSA DE OVOS DO
MOLUSCO AMPULLARIUS sp. (PELOTAS).

Tese apresentada ao Departamento
de Bioquímica da Universidade Fe
deral do Paraná para a obtenção
do título de Doutor em Bioquími-
ca.

Orientador: Dr. José Hazencleve Duarte

Coorientador: Dr. Philip Albert James Gorin

... são vãs e cheias de erros as ciências
que não nasceram da experiência, a mãe
de tôda certeza...

Leonardo da Vinci

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

v/v	=	volume/volume
p/p	=	peso/peso
p/v	=	peso/volume
g.l.c.	=	cromatografia em fase gasosa
T	=	tempo de retenção em g.l.c.
R_{Gal}	=	mobilidade relativa na cromatografia em papel
m/e	=	massa/carga do íon
V	=	volt
mA	=	miliampère
M	=	molar
cm	=	centímetro
d.i.	=	diâmetro interno
g	=	grama(s)
mg	=	miligrama(s)
°C	=	grau(s) Celsius
nm	=	nanometros
p.e.	=	ponto de ebulição
NMR	=	ressonância nuclear magnética
p.m.r.	=	NMR de próton
^{13}C -n.m.r	=	NMR de ^{13}C
TMS	=	tetrametilsilano
δ	=	deslocamento químico do sinal em p.m.r.
δ_{C}	=	deslocamento químico do sinal em ^{13}C -n.m.r
s	=	coeficiente de sedimentação
S	=	Svedberg

ÍNDICE

ABSTRACT.....	IV
RESUMO.....	V
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
Métodos gerais.....	13
Isolamento e purificação dos polissacarídeos.....	15
Hidrólise ácida dos polissacarídeos purificados..	16
Espectroscopia de p.m.r.....	17
Oxidação dos polissacarídeos pelo periodato e ácido fórmico liberado.....	17
Degradação de Smith dos polissacarídeos.....	18
Metilação dos polissacarídeos.....	19
Metanólise dos polissacarídeos metilados.....	20
Ressonância de ^{13}C -n.m.r. dos polissacarídeos...	21
Ultracentrifugação dos polissacarídeos.....	21
Preparação dos 2-octil glicosídeos acetilados....	22
Determinação enzimática da <u>D</u> -glucose nos polímeros	23
Determinação enzimática da <u>D</u> -galactose nos polí - meros.....	23
Determinação enzimática da <u>L</u> -fucose nos polímeros.	23
Preparação do treitol.....	24

Isolamento de 4-O- α -D-glucopiranosil- α , β -D-galactose.	24
Metilação do dissacarídeo.....	25
Ressonância de ^{13}C -n.m.r. do dissacarídeo obtido de T ₀ ..	25
Degradação controlada de Smith do polissacarídeo T ₀	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
Isolamento e purificação dos polissacarídeos.....	27
Composição dos polímeros T ₀ , T ₁₀ e T ₁₅	27
Ultracentrifugação dos polissacarídeos.....	28
Espectroscopia de p.m.r.....	34
Metilação, oxidação pelo periodato e degradação de Smith dos polissacarídeos.....	34
Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. dos polissacarídeos.....	42
AGRADECIMENTOS.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

ABSTRACT

A polysaccharide preparation, isolated from egg masses deposited by snails of an Ampullarius sp., was purified via precipitation with cetavlon in the presence of sodium borate, and found to contain galactose and a smaller proportions of glucose, and to have two components with 10S and 40S. Polysaccharide isolated from freshly laid egg masses was highly branched and consisted of non-reducing end-units of α -D-glucopyranose and β -D-galactopyranose, and 3,6-di-O-substituted β -D-galactopyranosyl units. One or more the polysaccharide components was a D-glucopyranose-D-galactopyranan with nonreducing end-units of α -D-glucopyranose linked (1 \rightarrow 4) to adjacent β -D-galactopyranosyl units. Such a structure, with α -D-glucopyranosyl units, have not previously been recognized in galactose-containing polysaccharides from egg masses and albumen glands of snails.

The polysaccharide preparations, obtained from freshly laid egg masses and from those which were left for 10 and 15 days after laying, were structurally different from each other. With the passage of time, progressive diminution of the 10S component and the proportion of glucose in polysaccharide took place, suggesting that each constituent was consumed preferentially by the snail embryos.

RESUMO

Preparações de polissacarídeos isolados das massas de ovos do molusco Ampullarius sp. (Pelotas) foram purificadas por precipitação com Cetavlon na presença de tampão borato, verificando-se serem compostas de unidades de galactose e uma menor proporção de glucose. A ultracentrifugação demonstrou serem as preparações constituídas de dois componentes, um com 10S e outro com 40S. O polissacarídeo isolado das massas de ovos coletadas logo após a oviposição é altamente ramificado e possui α -D-glucopiranose e β -D-galactopiranose nas extremidades não redutoras, e unidades β -D-galactopiranosídicas 3,6-di-O-substituídas. Um ou mais dos componentes dos polissacarídeos é D-glucopirano-D-galactopiranana com as extremidades não redutoras compostas de unidades de α -D-glucopiranose ligadas a unidades adjacentes de β -D-galactopiranose por ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 4). Uma estrutura desse tipo, com unidades α -D-glucopiranosídicas, não havia ainda sido descrita em polissacarídeos contendo galactose e isolados de massa de ovos ou glândula de albúmen de moluscos.

A preparação de polissacarídeo obtida das massas de ovos coletadas logo após a oviposição, e as preparações obtidas das massas de ovos coletadas após 10 e 15 dias da oviposição, são estruturalmente diferentes entre si. Com a passagem do tempo, acontece uma diminuição progressiva do componente 10S e um decréscimo paralelo na proporção de glucose, sugerindo que tais constituintes são consumidos, preferencialmente, pelo embrião do molusco.

INTRODUÇÃO

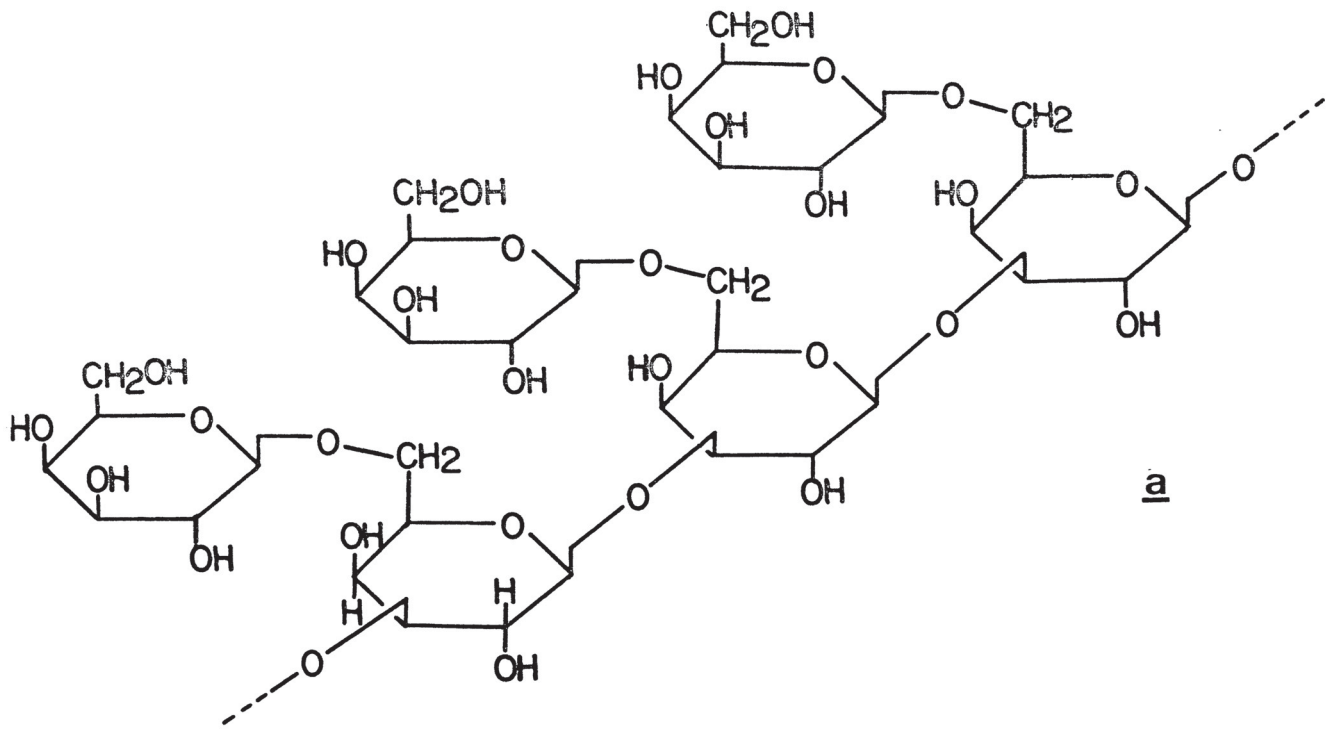
Química e Bioquímica dos polissacarídeos isolados de moluscos

HAMMARSTEN¹, em 1885, demonstrou a presença, na glândula de albúmen de Helix pomatia, de um polímero distinto do glicogênio e que ele denominou de "tierisches sinistrin". Desde então, grandes progressos têm sido alcançados no campo da química e da bioquímica dos polissacarídeos isolados de moluscos, o que é sumariado a seguir: o termo "galactogênio" para designar esse polímero ($[\alpha]_D -13,55^\circ$) foi proposto por MAY², por analogia ao "glicogênio" pelo fato de ser a molécula formada apenas por unidades de galactopiranosose³. No presente trabalho usaremos apenas o termo galactana para os polímeros. O mesmo autor⁴, em 1932, verificou na massa de ovos de H.pomatia, alta proporção de galactana (37,8% em peso seco) com uma rotação ótica de $[\alpha]_D -22,73^\circ$. Como a rotação ótica ($[\alpha]_D + 53,6^\circ$) do hidrolisado ácido da galactana da massa de ovos de H.pomatia⁴⁻⁵ não era compatível com aquela esperada para uma mistura em equilíbrio de α e β -D-galactopiranosose ($[\alpha]_D +80,5^\circ$), BALDWIN e BELL⁶ sugeriram a possibilidade de ser a galactana de H.pomatia constituída de unidades de D e L-galactopiranoses. Essa hipótese foi confirmada por BELL e BALDWIN⁷ e MAY e WEINLAND⁸⁻⁹ nas galactanas isoladas das massas de ovos e da glândula de albúmen de H.pomatia. Uma relação de 6:1 entre D e L-galactopiranosose foi observada por BELL e BALDWIN⁷ em galactanas de glândula de albúmen de H.pomatia enquanto que uma relação de 7:1 foi encontrada por MAY e WEINLAND⁸⁻⁹ em galactana isolada da massa de ovos do mesmo molusco. Recentemente a presença de D e L-galactose (relação de 6:1) foi confirmada na galactana de H.pomatia quando os componentes do hidrolisado ácido deste polímero foram analisados por cromatografia em fase

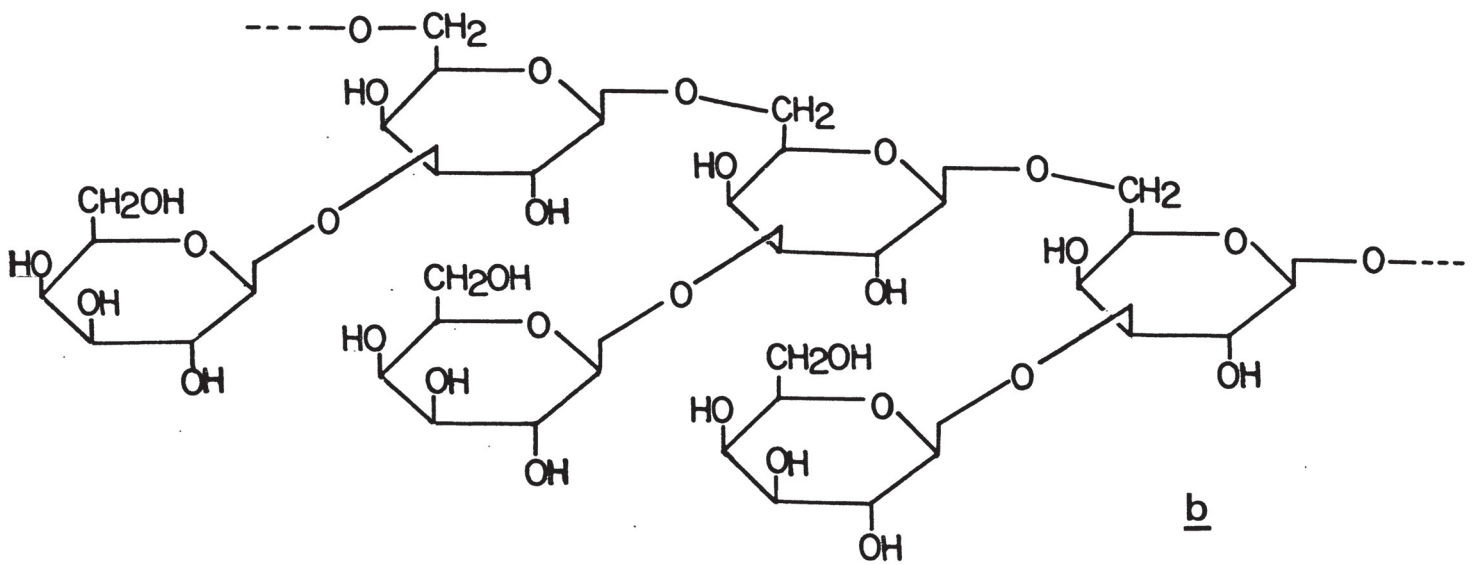
gasosa (g.l.c.) na forma de derivados (+)-2-octil galactosídeos acetilados¹⁰.

SCHLUBACH e LOOP¹¹ foram os precursores dos estudos de metilação em galactanas de moluscos. Estes autores, em 1937, verificaram que os produtos de hidrólise do polímero isolado do H.pomatia, quando metilados, apresentavam quantidades equimoleculares dos derivados tetra- e di-metil galactose e que foram identificados posteriormente por BALDWIN e BELL⁶ como sendo o 2,3,4,6-tetra-O-metil-galactopiranosose e o 2,4-di-O-metil-galactopiranosose. A partir desta verificação, BALDWIN e BELL⁶ postularam que a molécula da galactana deveria possuir um tipo de estrutura possível de ser formulada de duas maneiras alternativas (Fig.1): a) Uma cadeia principal formada por unidades de (1→3)-β-galactopiranosose em cujos carbonos primários (C-6) se ligam cadeias simples de β-galactopiranosose e b)-modelo alternativo que seria o inverso do primeiro, contendo uma cadeia principal de unidades de (1→6)-β-galactopiranosose em cujos carbonos C-3 se ligam cadeias simples de β-galactopiranosose. Uma estrutura desse tipo não permitiria, portanto, a obtenção de derivados tri-O-metilados no hidrolisado ácido do polissacarídeo metilado. No entanto, esta presença foi verificada por BELL e BALDWIN⁷ que, por esta razão, consideraram os derivados tri-O-metilados, isolados nos produtos do hidrolisado da galactana metilada, como provenientes de metilação incompleta.

Em 1953, O'COLLA¹² submetendo a galactana de H.pomatia à degradação de Barry, mostrou que os modelos estruturais alternativos propostos por BALDWIN e BELL⁶ eram, na realidade, uma simplificação, e que o polissacarídeo era do tipo arboriforme no qual as unidades de β-galactopiranosose estavam unidas por ligações glicosídicas alternadas (1→3) e (1→6) (Fig.2). Nessa nova estrutura proposta, as unidades terminais não redutoras e



a



b

Figura 1 - Modelos alternativos propostos por BALDWIN E BELL (6)

as unidades internas da molécula se apresentavam em quantidades equimoleculares, permitindo, teoricamente, que o hidrolisado ácido do polissacarídeo metilado apresentasse quantidades equimoleculares de 2,3,4,6-tetra- e 2,4-di-O-metil-D-galactopirano-se.

Desde então um grande número de polissacarídeos isolados de moluscos têm sido investigados. A galactana de glândula de albúmen de Biomphalaria glabrata foi estudada por CORREA et al¹³ e os resultados obtidos da degradação de Barry e oxidação com meta-periodato eram compatíveis com o modelo proposto por O'COLLA¹². Por outro lado, os dados de metilação obtidos da galactana de glândulas de albúmen de Strophocheilus oblongus¹⁴ não se adaptavam aos modelos até então propostos. DIAZ E DUARTE¹⁵ aplicando a degradação controlada de Smith à galactana da glândula de albúmen de S.oblongus, sugeriram um modelo estrutural altamente complexo para o polímero. HONDA¹⁶ estudando os oligossacarídeos obtidos da hidrólise ácida parcial da galactana isolada da glândula de albúmen de Megalobolimus paranaguensis, caracterizou duas séries homólogas de oligossacarídeos cujas estruturas se ajustavam ao modelo anteriormente proposto por DIAZ e DUARTE¹⁵. FEIJÓ e DUARTE¹⁷, investigando o polissacarídeo isolado da massa de ovos de Ampullarius sp. (Morretes) verificaram ser o polímero altamente ramificado e contendo D-galactose (98 mole%) e L-fucose (2 mole%) com os pontos de ramificação em C-3 e C-6 das unidades de β-D-galactopirano-se. Além das ligações β-(1→3) e β-(1→6) foi observada também uma percentagem (11 mole%) de unidades (1→2)-β-D-galactopirano-se, o que o diferenciava dos outros polissacarídeos de moluscos até então estudados. DUARTE¹⁸ caracterizou um polissacarídeo ácido na glândula de albúmen de Pomacea (=Ampullarius) lineata SPLX (Recife) que era composto de unidades de D-galactopirano-se, acetais de ácido pirúvico e grupos acetil numa relação molar de 17 : 1 : 14, respectivamente. A autora, embora não tenha esclare-

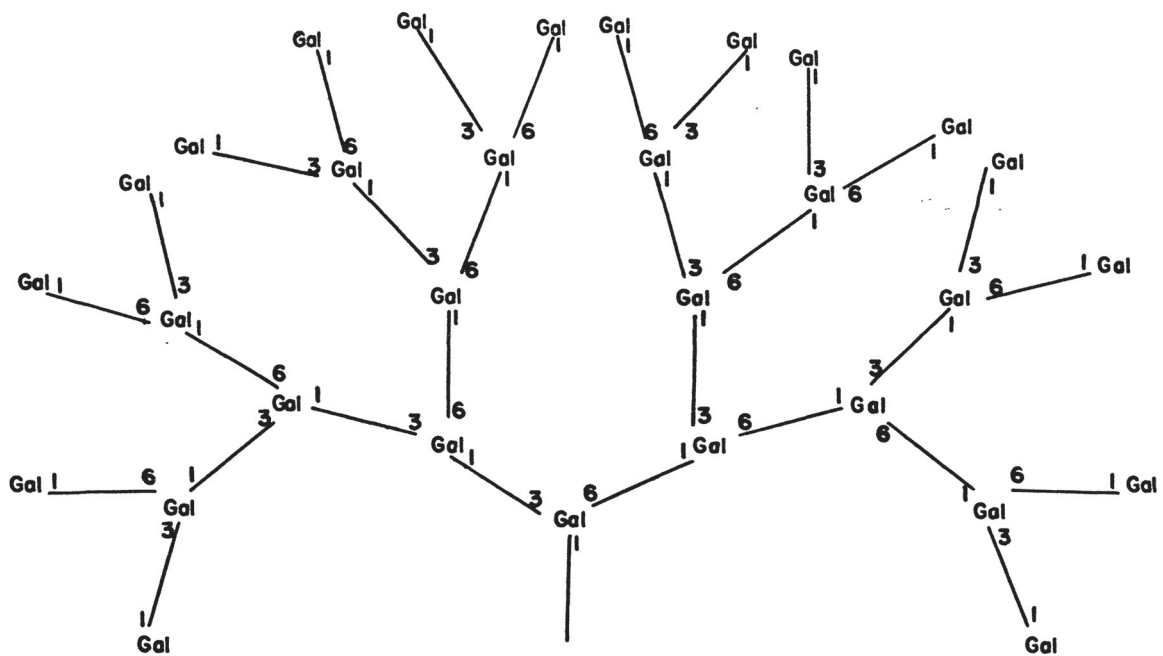


Figura 2 - Modelo proposto por O'COLLA (12) para o galactogênio de Helix pomatia.

cido a posição dos acetais de ácido pirúvico, demonstrou, entre tanto, que a ligação acetálica (carboxietilideno) deste cetoadiçido não envolvia os carbonos C-4 e C-6 das unidades do polímero. No entanto, em trabalho posterior¹⁹, a configuração acetálica do ácido pirúvico foi finalmente esclarecida e envolvia os átomos de oxigênio ligados aos carbonos C-3 e C-4 de algumas unidades de D-galactopiranosose constituintes do polissacarídeo.

Apesar de muitas galactanas isoladas de moluscos já terem sido estudadas, permanece ainda sem elucidação seus papéis biológicos. WEINLAND²⁰ demonstrou que existe uma enzima na glândula digestiva (hepatopâncreas) e no suco digestivo de H. pomatia que é capaz de hidrolisar a galactana contida na massa de ovos deste molusco sem, contudo, esclarecer seu mecanismo. É sabido que a galactana das glândulas de albúmen é semelhante à encontrada na massa de ovos dos respectivos moluscos. Isso sugere que as galactanas sintetizadas na glândula de albúmen sejam eliminadas juntamente com a massa de ovos¹². Após a hibernação dos moluscos²¹, a quantidade de galactana encontrada na massa de ovos de H. pomatia é maior que o decréscimo da quantidade do referido polímero verificado na glândula de albúmen, sugerindo o fato a possibilidade de uma transformação de glicogênio em galactogênio. Foi verificado²², no entanto, que na massa de ovos recente de H. pomatia não há glicogênio, só sendo possível sua detecção após o 16º dia do desenvolvimento embrionário do molusco. HORSTMANN²³ observou que 46 a 78% do galactogênio da massa de ovos de Lymnea stagnalis era consumido durante o período embrionário do molusco (25 dias) e que o glicogênio, mesmo em pequenas proporções, só aparecia na metade desse período. IACOMINI e DUARTE²⁴, estudando a galactana das massas de ovos de Biomphalaria glabrata coletadas logo após a oviposição verificaram, por metilação do polímero original, que este era composto de 43% de -

extremidades não redutoras, 43% de unidades de β -D-galactopiranosose 3,6-di-O-substituídas, 11% de unidades 3-O-substituídas e 3% de unidades 6-O-substituídas. Estudos de metilação no polímero obtido das massas de ovos do molusco após 5 dias de desenvolvimento embrionário, mostraram um decréscimo do número de unidades nas extremidades não redutoras e do número de unidades 3,6,di-O-substituídas (de 43% para 34%), um aumento do número de unidades 3-O-substituídas (de 11% para 19%) e de unidades 6-O-substituídas (de 3% para 11%). Essas investigações permitiram concluir que o embrião de B.glabrata consome a galactana a partir das extremidades não redutoras do polissacarídeo, fato é-se responsável pelo aumento aparente na percentagem de unidades de (1 \rightarrow 3)- e (1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosose.

Mesmo levando-se em consideração o grande número de trabalhos realizados sobre química de galactanas, muitos aspectos envolvendo a função biológica dessas macromoléculas permanecem ainda quase que inteiramente desconhecidos. Apesar de não terem sido ainda esclarecidos também os verdadeiros mecanismos de síntese e degradação das galactanas, quer na glândula de albúmen quer na massa de ovos, algumas investigações têm sido realizadas nesse campo. GOUDSMIT e RAM²⁵ postularam a hipótese de que o início do ciclo reprodutivo dos gastrópodos (H.pomatia) é desencadeado por neurohormônios. O órgão alvo, a glândula de albúmen de H.pomatia, quando incubada na presença de homogenato de cérebro do mesmo molusco (glânglios circunfaríngeos) mostra um aumento significativo (2-10 vezes) na atividade específica de galactana-¹⁴C.

Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética

A espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética - (NMR), tanto de ¹³C (¹³C-n.m.r.) como de próton (p.m.r.) é uma

técnica que tem sido amplamente utilizada na análise estrutural de polissacarídeos. Este método tem sido frequentemente usado para confirmar estruturas já determinadas por outras técnicas, tais como a análise por metilação, oxidação pelo periodato etc. No entanto, em alguns casos, tem sido usada para identificar certos substituintes como acetato e malonato, para determinar a configuração anomérica α ou β e se o anel do açúcar é piranosídico ou furanosídico. Nesse método procura-se relacionar os deslocamentos químicos dos sinais de ressonância obtidos nos espectros de determinado polímero com os deslocamentos químicos de sinais de estruturas químicas conhecidas. A ^{13}C -n.m.r. constituiu, até bem recentemente, uma área muito restrita da espectroscopia de NMR. Muito embora espectros de ^{13}C tenham sido obtidos com sucesso, mesmo por volta de 1957, essas investigações ocorriam em poucos laboratórios por uma série de dificuldades técnicas que foram, recentemente, superadas com a incorporação dos "Fourier transform" aos espectrômetros por volta de 1970. Mesmo que, em determinados casos, a ^{13}C -n.m.r. seja um complemento da Ressonância Nuclear de próton, na realidade ela preenche uma grande lacuna em relação a esta última técnica. A p.m.r., no entanto, é muito mais sensível do que a técnica do ^{13}C , o que é muito importante no caso de polissacarídeos que formam soluções viscosas.

ALLERHAND²⁶ é de opinião que a quantidade de informações que podem ser obtidas por p.m.r. diminui à medida que o tamanho e a complexidade da molécula aumentam. Esse fato é agravado pela tendência que têm os prótons, nos polímeros, de apresentarem valores muito baixos de T_2 ("Spin-spin relaxation time") e, portanto, sinais de ressonância com picos muito largos. Por outro lado, os espectros de ^{13}C -n.m.r., por apresentarem sinais bem

mais estreitos ("narrow line width"), são muito melhor resolvidos, tornando mais fácil a interpretação.

Em 1978, JENNINGS e SMITH²⁷ revisaram os métodos utilizados para a atribuição dos sinais usando, como exemplos, polissacarídeos selecionados, fornecendo os dados básicos para a obtenção de espectros de ^{13}C com desacoplamento dos sinais dos protons, modo que permite revelar muitas informações sobre as estruturas dos polímeros. Carboidratos foram largamente estudados utilizando-se técnicas do ^{13}C ²⁸. De modo análogo à p.m.r., a ^{13}C -n.m.r., permite a detecção, em polissacarídeos, de grupos substituintes tais como acetato, malonato, fosfato ou sulfato, de maneira relativamente simples. No entanto, para se determinar a posição da O-glicosilação é sempre necessário correlacionar cada sinal obtido no espectro com um determinado átomo de carbono da estrutura em estudo. Para tal, assume-se que o deslocamento químico dos sinais dos átomos de carbono dos polissacarídeos são quase iguais àqueles dos átomos de carbono dos monossacarídeos componentes e que possuam a mesma configuração e tamanho do anel. Um forte deslocamento do sinal para campo baixo ("downfield shift") ou efeito - α , significa O-glicosilação neste átomo de carbono, fenômeno este acompanhado, na maioria dos casos, por um pequeno deslocamento dos sinais dos átomos de carbono vizinhos para campo mais alto ("upfield shift") ou efeito- β .

DORMAN e ROBERTS²⁹, em 1971, no primeiro estudo sobre ^{13}C -n.m.r. em polissacarídeos, verificaram que o espectro do amido solúvel, contendo 10 a 15% de amilopectina, apresentava seis sinais de ressonância, e que estes sinais eram deslocados para campo alto quando se tratava a solução com NaOH 1M, com excessão dos sinais de C-5 e C-6. Isso foi atribuído à ruptura da hélice intramolecular com conseqüente mudança nos ângulos de torção ϕ e ψ das ligações glicosídicas, o que determina uma variação na blindagem

eletrônica dos átomos de carbono da estrutura. USUI³⁰ e colaboradores relataram dificuldades na obtenção de espectros de ^{13}C da amilopectina e do glicogênio em função da baixa solubilidade dos polímeros e da largura excessiva dos picos de ressonância. As investigações tornaram-se mais fáceis, no entanto, com a dextrina limite do glicogênio e da amilopectina de plantas, cujos sinais de ressonância são similares àqueles das estruturas originais. O espectro de ^{13}C da β -dextrina do glicogênio de fígado de coelho, por exemplo, foi comparado aos espectros de ^{13}C de isomalto-oligossacarídeos e estruturas de α -D-glucopiranosose (1 \rightarrow 4)-substituídas, confirmando-se assim a estrutura do polímero. COLSON³¹ e colaboradores, investigaram D-glucanas sintetizadas por enzimas isoladas de diversas cepas de Streptococcus mutans JG2. Estudos de metilação revelaram a presença de ligações glicosídicas dos tipos α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 6) com ramificações. A comparação dos sinais de ressonância de C-1 e dos átomos de carbono O-substituídos dos polissacarídeos com os sinais dos átomos de carbono de dissacarídeos e polissacarídeos conhecidos, excluiu qualquer possibilidade de ter o polímero uma outra estrutura além da prevista. GORIN³², analisando os espectros de ^{13}C de oligossacarídeos obtidos por acetólise parcial de mananas produzidas por leveduras, determinou os deslocamentos químicos dos sinais de ressonância dos átomos de carbono das estruturas em estudo. Tal fato torna hoje possível o estudo por ^{13}C -n.m.r de mananas que possuam sinais de ressonância em comum com os oligossacarídeos estudados. Utilizando-se os dados de ^{13}C -n.m.r e de metilação foi possível demonstrar³³ que a D-galacto-D-manana obtida por extração alcalina das hifas de Aspergillus niger 2022 possui cadeias laterais médias de 4 unidades de (1 \rightarrow 5) β -D-galactofuranose unidas ao núcleo da manana por ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 6). A presença da galactose

na forma furanosídica e não piranosídica ficou demonstrada pelo sinal de C-1 que, no caso das unidades β -D-galactofuranosil, aparece em campo muito baixo (δ_c 106,6-109,5).

Como podemos ver, muitos polissacarídeos têm sido estudados e suas estruturas químicas definidas com o emprego da espectroscopia de ^{13}C -n.m.r e p.m.r. . No entanto, estas técnicas não têm sido aplicadas às investigações de polímeros de D-galactopirranose.

Uma das finalidades do presente trabalho é, estudando o polissacarídeo isolado da massa de ovos de Ampullarius sp. (Pelotas), contribuir para o esclarecimento de sua estrutura, utilizando para tal, além das técnicas analíticas convencionais, a espectroscopia de NMR. Como sabemos que os espectros de polissacarídeos podem ser interpretados com base nos espectros de compostos similares mais simples como, por exemplo, os derivados mono-O-metil dos correspondentes metil glicosídios³⁴⁻³⁵, êsses derivados foram analisados por ^{13}C , assim como os oligossacarídeos estruturalmente relacionados ao polímero original.

Como é sabido, em vários moluscos gastrópodos a galactana é sintetizada na glândula de albúmen e degradada na massa de ovos pelo molusco ainda na sua fase embrionária, época em que o mesmo ainda não dispõe de glicogênio.

No entanto, o mecanismo de degradação da galactana na massa de ovos, assim como vários aspectos relacionados com sua síntese, não foram ainda elucidados.

Por êste motivo, uma outra finalidade da presente investigação é comparar a estrutura do polissacarídeo original, isolado da massa de ovos de Ampullarius sp. (Pelotas) logo após a oviposição, com as estruturas dos polímeros obtidos das massas de ovos do mesmo molusco após 10 e 15 dias de desenvolvimento embrionário. Um estudo comparativo dessa natureza contribui-

rã para o esclarecimento do mecanismo pelo qual o embrião de Ampullarius sp. (Pelotas) degrada o polissacarídeo da massa de ovos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Métodos gerais: A polarimetria dos polissacarídeos foi obtida com polarímetro Perkin-Elmer modelo 141 a 25°C. Os polímeros - foram submetidos a eletroforese em equipamento Perkin-Elmer 38 (tampão borato pH 9,0; 20 mamp e 150V), e em celogel com equipamento Fanem de acordo com DUDMAN e BISHOP³⁶, apresentando apenas uma banda. A espectrometria em infra-vermelho foi determinada em discos de KBr em espectrofotômetro Beckman IR-8. A g.l.c. foi realizada em cromatógrafo F&M modelo 810 R-12, com ionização de chama, e em cromatógrafo Jeol JGC-20K, com ionização de chama, utilizando-se He e N₂ como gás de arraste e nas seguintes colunas: a) 3% p/p de ECNSS-M em Chromosorb W de 80-100 mesh³⁷ (0,4 cm d.i.; 4 pés) de 120°C a 170°C (4°C/min., "Then hold"), com detetor a 250°C, câmara de injeção a 195°C e fluxo de gás de arraste de 10ml/min.; b) OV-225 em coluna capilar de vidro com 30m, de 95°C a 230°C (2°C/min.)³⁸; c) 3% p/p de OV-225 em Chromosorb Q de 80-100 mesh, com coluna de 120x0,4cm (d.i.)³⁹, isoterma a 190°C com programação de temperatura (130°C a 190°C; 4°C/min.), com detetor a 250°C, câmara de injeção a 220°C e fluxo de gás de arraste de 40ml/min.; d) OV-17 e OV-225 (3:1) em coluna capilar de vidro com 30m, de 95°C a 230°C. A análise quantitativa foi feita na coluna (a) usando-se os derivados alditol acetatos parcialmente metilados. Nas colunas (a), (b) e (c) os tempos de retenção dos derivados foram referidos ao do 1,5 di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosídeo. Em algumas análises por g.l.c. as áreas dos picos foram calculadas por triangulação⁴⁰ e em outras o foram por integração automática. A espectrometria de massa foi realizada com os derivados alditol acetatos parcialmente metilados em espectrômetro marca Finnigan (g.l.c.-m.s.) modelo 4000, acoplado

a um sistema de dados Inco 2.300. Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons, repetitivamente a cada 2 segundos, desde - massa 40 até massa 420. G.l.c. foi feita usando-se coluna de OV-225 (Chrompack Canadá, R.R.2, Blenheim, Ontario, NOP 1AO, Canadá) com 30mx0,25mm(d.i.). As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50°C com a finalidade de se obter uma faixa estreita dos solutos⁴¹, e então rapidamente programada (40°C/min.) a 182°C("hold"). O gás de arraste foi He com a velocidade linear de 22cm/s.

Os diferentes polissacarídeos obtidos foram: T₀, isolado das massas de ovos do molusco Ampullarius sp. (Pelotas) logo após a oviposição (6-10h); T₁₀, isolado das massas de ovos do mesmo molusco após 10 dias de permanência destas nas paredes do aquário e T₁₅, isolado das massas de ovos do mesmo molusco após uma permanência das mesmas por 15 dias nas paredes do aquário. Os polissacarídeos hidrolizados (H₂SO₄ 0,5M; 100°C; 18h; neutralização com BaCO₃)⁴² foram submetidos a cromatografia em papel Whatman nº 1 e nº 4 usando-se os seguintes sistemas de solventes: e) 1:5:3:3 (fase superior) benzeno-1-butanol-piridina-água; f) 9:2:2 acetato de etila-piridina-água; g) 200:17:1 butanona - água-amônia. Os açúcares foram visualizados com nitrato de prata alcalino⁴³ ou cloridrato de p-anisidina (derivados metilados)⁴⁴. A mobilidade dos açúcares livres em cromatografia em papel foi relacionada à da D-galactose (R_{Gal}), e a mobilidade dos açúcares metilados foi relativa à do 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosídeo (R_G). A cromatografia em camada delgada foi executada em sílica-gel com os seguintes sistemas de solventes: h) 9:1 benzeno-metanol e i) 200:47:15:1 benzeno-etanol-água-ácido acético. A visualização foi feita com ácido sulfúrico-etanol a 5% a 150°C. A mobilidade dos alditol acetatos foi expressa em relação à do D-arabinitol pentacetato.

A acetilação dos açúcares foi feita com anidrido acético-piridina (1:1) por 4h a 100°C. Esta mistura foi tratada com água (2 - 4°C) e os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina contida na solução foi eliminada por tratamentos sucessivos com solução de ácido sulfúrico 1M. A piridina restante foi eliminada por evaporações sucessivas com tolueno.

A determinação do açúcar total e das proteínas foi feita pelos métodos do fenol-ácido sulfúrico⁴⁵ e de LOWRY⁴⁶, respectivamente.

Isolamento e purificação dos polissacarídeos: Moluscos de gênero Ampullarius sp. foram coletados no mês de maio de 1977 nos pequenos valos da praia do Laranjal e que desaguam na Lagoa dos Patos, na cidade de Pelotas, RGS (Brasil), e colocados em aquário com aeração artificial. Os moluscos (alimentados diariamente com folhas de agrião) depositaram suas massas de ovos diretamente nas paredes de vidro do aquário. Aquelas massas de ovos coletadas logo após a oviposição (6-10h) (32 massas de ovos), foram referidas como tempo zero. As massas de ovos restantes foram deixadas nas paredes do aquário por mais tempo; aquelas coletadas após 10 dias da oviposição (28 massas de ovos) foram referidas como tempo dez, e aquelas coletadas após 15 dias da oviposição (25 massas de ovos), referidas como tempo quinze. As massas de ovos restantes, em número de 17 (controle da eclosão), permaneceram nas paredes do aquário após o 15º dia e, nas condições do experimento, cerca de 100% dos seus ovos eclodiram entre o 16º e 17º dia, liberando os moluscos com cerca de 2mm de diâmetro.

As massas de ovos assim obtidas (tempo zero, tempo dez e tempo quinze) foram homogenizadas com acetona (200ml) em liquidificador e o material centrifugado. Os resíduos dos polímeros foram então tratados com uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1v/v)

(100 ml) e novamente centrifugados. Os resíduos assim obtidos foram tratados com n-butanol saturado com água (150ml), em refluxo, durante 6 horas. Após filtração dessas misturas, os sólidos obtidos foram lavados com acetona, secos à temperatura ambiente e, em seguida, a vácuo (dessecador com pentóxido de fósforo). Os pós cetônicos ($T_0=33g$; $T_{10}=28g$; $T_{15}=22g$) foram então suspensos em acetato de amônio 0,1M (600ml; pH 8.5) e submetidos a desproteíntização com protease Sigma (2x100mg para cada sistema). As três misturas foram deixadas 72 h a 37°C com tolueno como preservativo. Após esse tempo, as soluções contendo os polissacarídeos foram centrifugadas e submetidas a desproteíntização pelo método de Sevag⁴⁷. Após nova centrifugação, as frações aquosas obtidas no processo de Sevag, foram tratadas com etanol (3 volumes) e novamente centrifugadas. Os materiais precipitados foram então lavados com acetona, secos à temperatura ambiente, dissolvidos em água e liofilizados. Os resíduos secos ($T_0=1,8g$; $T_{10}=1,5g$ e $T_{15}=1,4g$) foram dissolvidos em água (100ml) e fracionados por adição de brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon) a 5% (100ml). Os produtos obtidos após tratamento com ácido acético 2N e precipitação com etanol ($T_0=1,0g$; 55,5% $[\alpha]_D^{25}+43,8^\circ$ (c,1 em água); $T_{10}=0,9g$; 60,0% $[\alpha]_D^{25}+41,2^\circ$ (c,1 em água); $T_{15}=0,8g$; 57,1% $[\alpha]_D^{25}+40,8^\circ$ (c,1 em água), apresentaram apenas um pico quando submetidos a análise cromatográfica em Sephadex G-200 (coluna 80x2cm; 10ml/h) e em Sepharose 6B-100 (Sigma Chemical Co.) (coluna 100x2cm; 12ml/h).

Hidrólise ácida dos polissacarídeos purificados: Amostras dos polissacarídeos T_0 , T_{10} e T_{15} (10mg de cada um) foram hidrolisadas com H_2SO_4 0,5M (1ml) durante 18 horas a 100°C em ampôlas seladas. Após neutralização do ácido (carbonato de bário pH 4,5) e concentração a vácuo (evaporador rotatório), os produtos dos 3 sistemas de hidrólise foram analisados por cromatografia em papel

(solvente e) e visualizados com p-anisidina-HCl. Parte de cada um dos sistemas de hidrólise tiveram seus açúcares reduzidos - com boridreto de sódio e os álcoois resultantes foram acetilados (piridina-anidrido acético 1:1 v/v). Os alditol acetatos - assim obtidos foram analisados por g.l.c. (coluna c) o que revelou a presença de galactitol hexacetato e glucitol hexacetato nos hidrolisados de T₀, T₁₀ e T₁₅ (Tabela I).

Espectroscopia de p.m.r: Para a Ressonância de p.m.r. o polissacarídeo T₀ (300mg) foi dissolvido em D₂O (4ml) e os espectros obtidos em espectrômetros Varian HA-100 e Varian XL-100 a 70°C. Os deslocamentos químicos (δ) foram baseados no deslocamento químico do TMS, contido num capilar coaxial ao tubo da amostra (TMS externo). Os espectros incorporaram 2.048 "data points" com "sweep width" de 1000 Hz, "acquisition time" de 1s e "pulse width" de 25 μs .

Oxidação dos polissacarídeos pelo periodato e ácido fórmico liberado: Uma amostra de cada polissacarídeo (50mg de cada um) - foi oxidada com meta-periodato de sódio 0,01M(100ml) a 0-2°C na ausência de luz. Alíquotas de 5 ml das soluções foram analisadas para o consumo de periodato⁴⁸ o que foi calculado do seguinte modo:

$$\text{Molaridade da solução oxidante} = X = \frac{(B-A) \cdot \text{Normalidade do tiosulfato}}{\text{ml da alíquota} \cdot 2}$$

$$\frac{\text{Moles de periodato}}{\text{Mol hexose anidra}} = \frac{\text{Volume total solução oxidante} \cdot X \cdot .162}{\text{g de polissacarídeo} \cdot 10^3}$$

Onde: B = ml de tiosulfato gastos na titulação do branco

A = ml de tiosulfato gastos na titulação da amostra

Após 95 horas o polímero T_0 havia consumido 0,9 mole de periodato; T_{10} havia consumido 0,8 mole de periodato e T_{15} havia consumido 0,8 mole de periodato (Fig.7). Todos esses valores representam o consumo de periodato/mol de hexose anidra e todos foram obtidos por extrapolação para o tempo zero.

O ácido fórmico liberado/mol de hexose anidra em cada um dos sistemas de oxidação após 95 horas (0,40 para T_0 ; 0,36 para T_{10} e 0,36 para T_{15}) foi determinado pelo método de BARKER e SOMERS⁴⁹ e por titulação potenciométrica em atmosfera de nitrogênio⁵⁰. O calculo foi feito com a seguinte equação:

$$\frac{\text{Moles de ácido fórmico liberados}}{\text{Mol de hexose anidra}} = Y$$

$$Y = \frac{\text{ml de NaOH} \cdot \text{Normalidade NaOH} \cdot \text{Volume solução oxidante} \cdot 162}{\text{ml da alíquota} \cdot \text{g do polissacarídeo} \cdot 10^3}$$

Degradação de Smith dos polissacarídeos⁵¹⁻⁵²: Uma amostra (50 mg) de cada um dos polímeros foi oxidada com meta-periodato de sódio 0,01M (100ml) por 95 horas a 0-2°C na ausência de luz. O excesso de oxidante foi então destruído pela adição de etileno glicol (1ml) e as soluções foram dialisadas contra água corrente por 48 horas. As soluções foram concentradas até pequeno volume (5ml) e os polissacarídeos oxidados foram reduzidos com NaBH_4 (50mg para cada sistema) e após 12 horas o excesso de redutor foi destruído pela adição de ácido acético 2M (pH 7,0). Após diálise de 24 horas contra água corrente, os três sistemas foram concentrados (1ml) e submetidos a hidrólise com H_2SO_4 M por 5 horas a 100°C. Neutralizados com carbonato de bário até pH 4,5 os produtos de T_0 , T_{10} e T_{15} foram tratados com NaBH_4 (50mg para cada sistema) por 12 horas.

Após remoção dos cations com resina Dowex X-8(H⁺) (200-400 mesh), os íons borato foram eliminados por tratamentos sucessivos com metanol e evaporação a vácuo. Os produtos da degradação de Smith dos polissacarídeos T₀, T₁₀ e T₁₅ foram então analisados por cromatografia em papel e cromatografia em fase gasosa na forma de alditol acetatos (coluna c) demonstrando a presença de glicerol, treitol e galactitol nas proporções mostradas na Tabela II. A quantificação foi feita comparando-se as áreas dos picos do glicerol, treitol e galactitol com a do pico do arabinitol - pentacetato usado como referência quantitativa interna.

Metilação dos polissacarídeos: Os polímeros foram metilados 4 vezes pelo método de HAWORTH⁵³ do seguinte modo: os polissacarídeos (0,5g de cada um) foram dissolvidos em água (10ml) e tratados com 25 ml de NaOH a 40% e 12 ml de dimetilsulfato. Esses reagentes foram adicionados aos sistemas de metilação gota a gota durante um intervalo de tempo de 4 horas, sob agitação constante (agitador magnético) e à temperatura ambiente. Durante o processo acrescentou-se acetona a cada um dos sistemas (20ml) contendo os polissacarídeos parcialmente metilados. Em seguida, as 3 soluções foram neutralizadas com H₂SO₄ diluído (pH 7,0) e os sais foram removidos por diálise contra água corrente por 48 horas e, finalmente, concentradas a vácuo. Esse processo foi repetido mais três vezes. No final dessa etapa de metilação houve uma recuperação de cerca de 0,45g dos polissacarídeos T₀, T₁₀ e T₁₅ parcialmente metilados (± 90% de rendimento). Os produtos - assim obtidos foram dissolvidos em tetrahydrofurano (25ml) e tratados com NaOH pulverizado (5g) e sulfato de metila (6ml)⁵⁴⁻⁵⁵, gota a gota. As misturas de reação foram mantidas à temperatura ambiente sob agitação constante (agitador magnético) durante 16 horas.

Após esse tempo, o solvente foi evaporado a vácuo e os resíduos solubilizados com água (10ml) foram neutralizados com ácido sulfúrico 3M (pH 7,0). Após diálise, as soluções contendo os polímeros parcialmente metilados foram, finalmente, liofilizadas. Esse processo de metilação foi repetido mais uma vez, apresentando uma recuperação de cerca de 0,4g de cada um dos polissacarídeos parcialmente metilados (80% de rendimento).

Como os polímeros parcialmente metilados derivados de T₀, T₁₀ e T₁₅ ainda apresentavam pequena absorção de grupos OH quando submetidos à espectroscopia no infra-vermelho, foram metilados mais uma vez pelo método de HAKOMORI⁵⁶ da seguinte maneira: uma amostra de cada polissacarídeo parcialmente metilado (40mg de cada um) foi dissolvida em dimetilsulfóxido (5ml) e tratada com 10ml da solução do íon metil-sulfinil por 8 horas à temperatura ambiente e com agitação constante. Adicionou-se então 15ml de iodeto de metila a cada um dos sistemas. Após 15min., interromperam-se as reações e submeteram-se os sistemas à diálise por 24 horas contra água corrente extraíndo-se, finalmente, os polissacarídeos metilados com clorofórmio. Após evaporação verificou-se uma recuperação de cerca de 25 mg dos polissacarídeos já metilados derivados de T₀, T₁₀ e T₁₅ (50% de rendimento).

Os polímeros metilados dissolvidos em clorofórmio foram tratados com éter de petróleo (p.e.30-60°C) e submetidos a centrifugação. Os polissacarídeos já secos (T₀, $[\alpha]_D^{25} - 15^\circ$ (c, 1 em clorofórmio); T₁₀, $[\alpha]_D^{25} - 9,0^\circ$ (c, 1 em clorofórmio) e T₁₅, $[\alpha]_D^{25} - 12^\circ$ (c, 1 em clorofórmio) não mostraram mais absorção para grupos OH em espectroscopia no infra-vermelho.

Metanólise dos polissacarídeos metilados: Os polímeros metilados (100mg de cada um) foram tratados com a mistura de metanol-HCl a 5% (10ml) por 5 horas a 100°C em ampôla selada. As soluções resfriadas foram neutralizadas com carbonato de prata e as misturas

dos metil glicosídeos obtidos dos polissacarídeos metilados derivados de T₀, T₁₀ e T₁₅ foram deixadas na forma redutora por tratamento com HCl 0,5M (5ml) por 5 horas a 100°C. Uma vez resfriadas, as soluções foram neutralizadas com carbonato de prata⁵⁷, filtradas e liofilizadas. Os açúcares metilados na forma redutora foram tratados com NaBH₄ (pelo mesmo método já antes descrito na degradação de Smith) e os produtos foram acetilados (anidrido acético-piridina 1:1 v/v)⁵⁸. Os alditol acetatos parcialmente metilados derivados de T₀, T₁₀ e T₁₅ foram então analisados por g.l.c. nas colunas (a) e (b) (Tabela III).

Ressonância de ¹³C-n.m.r. dos polissacarídeos: Os espectros de Ressonância de ¹³C-n.m.r. dos polissacarídeos (300mg de cada um) foram obtidos em espectrômetro Varian XL-100-FT, usando-se D₂O como solvente a 70°C. Os espectros incorporaram 4.096 "data points" com "sweep width" de 5.000 Hz (198,4 ppm). Em cada espectro o "acquisition time" foi de 0,4s e o "pulse width" de 20 μs. Os deslocamentos químicos (δ_C) foram expressos em relação ao do TMS determinado em experimento separado (D₂O "lock")⁵⁹.

Ultracentrifugação dos polissacarídeos⁶⁰: 10mg de cada polissacarídeo foram utilizados para os experimentos de ultracentrifugação, e os coeficientes de sedimentação determinados em NaOH 0,5M (2ml) a 20°C com 28.000-30.000 r.p.m. . As exposições fotográficas foram executadas a intervalos de 2 minutos após a velocidade atingir 30.000 r.p.m. . As seguintes etapas foram necessárias para o cálculo dos coeficientes de sedimentação dos polímeros:

a) Medir a distância x (distância entre a ordenada máxima de cada pico e a borda do eixo que, no presente caso, estava a 7,3cm do centro de rotação do motor). Repetir a operação para cada fotografia obtida.

b) Multiplicar por M(fator de ampliação) para transformar x na distância real (em cm).

c) Subtrair esse valor de 7,3 para determinar a distância do pico ao centro da rotação do rotor.

d) Determinar \log_{10} de $(7,3-x.M)=\log \tau$

e) Graficar $\log \tau$ contra tempo (min.)

f)° Determinar a inclinação = $\frac{d \log \tau}{dt}$

g) $s = \frac{1}{\omega^2} \times \frac{d \ln \tau}{dt}$ onde $\omega^2 = \text{radianos/segundo} = \left(2 \pi \frac{\text{r.p.m.}}{60}\right)^2$

e onde $\frac{d \ln \tau}{dt} = \frac{2,303}{60} \times \frac{d \log \tau}{dt}$

h) Dividir o valor obtido por 10^{-13} para expressar o resultado em unidades Svedberg(S). Considerar que \underline{s} é o símbolo para o coeficiente de sedimentação e \underline{S} é usado para expressar unidades Svedberg (por exemplo, $s=9,3 S$).

Desde que o coeficiente de sedimentação é dependente da concentração, as amostras devem ser analisadas, sempre que possível, a diversas concentrações e os valores obtidos extrapolados para a concentração zero. O coeficiente de sedimentação é então expresso por s^0 . Como as amostras dos polissacarídeos T_0 , T_{10} e T_{15} foram analisadas a diferentes concentrações, os coeficientes de sedimentação devem ser expressos como $s^0_{20;0,5M NaOH}$.

Utilizando-se esse método foi possível verificar que os polissacarídeos obtidos das massas de ovos de Ampullarius sp. (Pelotas) a diferentes tempos de desenvolvimento embrionário - apresentam, pelo menos, 2 componentes, um com 40S e outro com 10S (Figura 5).

Preparação dos 2-octil glicosídeos acetilados: O polissacarídeo foi hidrolisado com ácido sulfúrico 0,25M a 100°C "overnight" , o ácido neutralizado com carbonato de bário e a solução liofiliz

zada. Os açúcares (0,3-3mg) obtidos por hidrólise do polissacarídeo T₀ foram transferidos a uma ampôla juntamente com uma gota de ácido trifluoroacético, (-)-2-octanol (0,5ml) e uma pequena barra magnética revestida com vidro. A ampôla foi fechada e aquecida, com agitação, em banho de óleo a 130°C "overnight". A solução foi então concentrada à secura em evaporador rotatório conectado a uma bomba de óleo, com a temperatura do banho a 55°C.

A solução do produto em anidrido acético-piridina (1:1,1ml) foi deixada a 100°C por 20 min. e então concentrada. O excesso de reagentes foi removido por codestilação com atanol.

A análise por g.l.c. dos derivados foi executada em coluna de vidro de SP-1000 (25mx0,25mm) a 230°C, e permitiu excluir, na estrutura de T₀, a presença de L-galactose.

Determinação enzimática da D-glucose nos polímeros: Uma amostra do hidrolisado ácido do polissacarídeo (5mg) foi incubada a 37°C por 1 hora com o reativo⁶¹ de glucose oxidase, peroxidase e o-dianisidina. Após leitura fotolorimétrica a 420nm, o polissacarídeo T₀ apresentou 29,6% de D-glucose.

Determinação enzimática da D-galactose nos polímeros: Uma amostra do hidrolisado ácido do polímero (5mg) foi incubada a 30°C por 1 hora com o reagente peroxidase e o-dianisidina e da enzima galactose oxidase purificada de Dactylium dendroides⁶²⁻⁶³. Após leitura fotolorimétrica a 420nm, o polímero T₀ apresentou 65,0% de D-galactose.

Determinação enzimática da L-fucose nos polímeros⁶⁴: A L-fucose desidrogenase obtida do meio de cultivo do fungo Pullularia pullulans foi utilizada para a determinação da L-galactose, em

virtude de ser esta enzima específica para L-fucose e L-galactose. O sistema de incubação continha 50 μ moles de tampão glicina/NaOH; pH 10,0; 3 μ moles de NAD^+ ; 0,1 a 0,2 unidades de enzimas purificadas e 0,1 e 0,2 ml do hidrolisado ácido total do polissacarídeo. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro Varian 635D, termostatizado a $30^\circ\text{C} \pm 0,1$, no comprimento de onda de 340nm. Nenhuma atividade foi observada que permitisse supor a presença de L-galactose, o que confirmou os dados verificados na análise dos 2-octil glicosídeos acetilados obtidos do polímero original.

Preparação do Treitol⁶⁵: D-galactose cristalina (1g) dissolvida em 1,2ml de água, foi tratada com ácido acético glacial (50ml). A solução foi submetida à agitação magnética (externamente resfriada a $16-18^\circ\text{C}$) e acrescentou-se, aos poucos, num período de 10 min., 4g de tetracetato de chumbo. Após 15 min., à temperatura ambiente, a mistura de reação foi tratada com ácido oxálico (0,8g dissolvidos em 10 ml de ácido acético) e filtrada. O filtrado foi concentrado a 35°C . O xarope obtido foi dissolvido em acetato de etila (25ml) e a solução foi extraída duas vezes com porções de água gelada (2ml) e então seca com sulfato de sódio anidro. A evaporação do acetato de etila a 35°C originou um xarope incolor (principalmente di-O-formil-D-treose) o qual foi dissolvido em ácido sulfúrico 0,05M(4ml) e deixado por 5 horas a 35°C para haver a hidrólise do grupo formiato. O hidrolisado foi neutralizado por adições sucessivas de resina Dowex-1, regenerada com bicarbonato de sódio N e a resina filtrada e lavada. Os filtrados combinados continham cerca de 0,5(75%) de D-treose que foi reduzida pelo boridreto de sódio originando o Treitol.

Isolamento de 4-O- α -D-glucopiranosil- α , β -D-galactose: O polissacarídeo (500mg) foi parcialmente hidrolisado com H_2SO_4 0,5M -

(50ml) a 70°C por 2 horas. A solução foi neutralizada com BaCO₃, filtrada e o filtrado evaporado até dar origem a um produto xaroposo. Esse produto foi fracionado em uma coluna de celulose usando-se, como eluente, acetona-água (7:1 v/v) que elui glucose e galactose, e acetona-água (4:1 v/v) que elui um dissacarídeo com $[\alpha]_D^{25} + 130^\circ\text{C}$ (c, 0,2 em água). A hidrólise ácida do dissacarídeo evidenciou glucose e galactose (estimados como alditol acetatos).

Metilação do dissacarídeo : O dissacarídeo (5mg) em água (10 ml) foi tratado com dimetil sulfato (1ml) e, durante 1 hora, adicionou-se solução aquosa de NaOH gota a gota para manter o pH entre 6 e 10. Esse processo metila a extremidade redutora e torna o dissacarídeo estável a alcali, de tal modo que pode ser metilado pelo método de Haworth (já citado anteriormente). Depois da adição de todo dimetilsulfato, a solução foi aquecida para remover o excesso de reagentes e então neutralizada com AcOH. A solução foi submetida a extração contínua com clorofórmio em um extrator por 18 horas. O extrato foi evaporado e o resíduo metilado por refluxo em iodeto de metila (5ml) contendo óxido de prata (2g) por 66 horas. Os produtos foram obtidos por filtração após lavagem do Ag₂O com CH₂Cl₂. Os produtos foram então convertidos a O-metilhexitois acetilados pelo processo usual e analisados por g.l.c.-m.s. usando-se a coluna (d) demonstrando-se a presença de 2,3,4,6-tetra-O-metil glucitol (53%) e 2,3,6-tri-O-metil galactitol (47%), indicando uma estrutura principal de 4-O- α -D-glucopiranosil-D-galactose.

Ressonância de ¹³C-n.m.r. do dissacarídeo obtido de T₀: O espectro de ¹³C-n.m.r. do dissacarídeo (15mg) obtido do polissacarídeo T₀ foi obtido com condições experimentais idênticas aque-

las usadas para os espectros de ^{13}C -n.m.r. dos polissacarídeos .

Degradação controlada de Smith do polissacarídeo T₀: Os poliois (35mg) obtidos após oxidação pelo meta-periodato de sódio (já - descrito) foram dissolvidos em água (10ml), ajustando-se o pH 2 com H_2SO_4 diluído, e a solução aquecida a 100°C por 1 hora⁶⁶. O ácido foi removido com Dowex 1-X8 (HCO_3^-) e a solução foi diali_sada. O material dialisável (23mg) foi examinado por cromatogra_fia em papel evidenciando a presença de glicerol e uma pequena proporção de treitol. O polissacarídeo não dialisado (8mg), quan_do observado por ^{13}C -n.m.r., apresentou um espectro no qual não havia o sinal de C-1 das unidades α -D-glucopiranosídicas nem o sinal de C-4 das unidades de galactose 4-O-substituídas (Figura 10).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e purificação dos polissacarídeos: Os polissacarídeos isolados das massas de ovos do molusco Ampullarius sp. (Pelotas) a diferentes tempos de desenvolvimento embrionário (0-10 e 15 dias), depois da remoção das proteínas sob condições suaves (enzima proteolítica e método de Sevag) foram purificados por complexação com Cetavlon na presença de tampão borato (pH 8,5). Os polímeros assim obtidos (T_0 , das massas de ovos coletadas logo após a oviposição; T_{10} , das massas de ovos coletadas após 10 dias de desenvolvimento embrionário e T_{15} , das massas de ovos coletadas após 15 dias de desenvolvimento embrionário) apresentaram apenas uma banda quando submetidos a eletroforese. Embora a análise de ultracentrifugação do polímero T_0 tenha demonstrado dois componentes nesta fração, não foi possível dissociá-los utilizando-se peneiras moleculares. No presente trabalho não foi tentado outro processo de separação desta fração, visto que para a finalidade a que se propõe o presente, o material foi julgado apto. Os polissacarídeos não continham nitrogênio nem grupos carbonila quando submetidos à espectroscopia no infra-vermelho.

Composição dos polímeros T_0 , T_{10} e T_{15} : O conteúdo em polissacarídeo nas massa de ovos de Ampullarius sp. (Pelotas) (3% em peso seco para T_0) é menor do que aquele encontrado nas massas de ovos de outros moluscos^{4, 17, 23} e varia muito pouco durante o período de desenvolvimento embrionário do molusco (2,5% em peso seco no 10º dia e 2,0% em peso seco no 15º dia).

Os produtos da hidrólise ácida dos polissacarídeos foram caracterizados por cromatografia em papel e por g.l.c. como D-galactose e D-glucose (Tabela I) o que os torna totalmente dis

tintos dos polissacarídeos isolados de moluscos até agora. Nenhuma evidência foi encontrada para a presença de L-galactose ou unidades de galactofuranose. Como pode ser visto na Tabela I, o número de unidades de D-glucose decresce de 24,2 moles% (em T₀) para 11,3 moles% (em T₁₅) enquanto que há um aumento do número de unidades de D-galactose de 75,8 mole % (em T₀) para 88,7 mole % (em T₁₅).

As rotações óticas dos polímeros, $[\alpha]_D^{25} + 43,8^\circ$; $[\alpha]_D^{25} + 41,2^\circ$ e $[\alpha]_D^{25} + 40,8^\circ$; respectivamente, são mais altas do que o valor de $[\alpha]_D + 21^\circ$ relatada para os β -D-galactopiranos, sugerindo que, pelo menos, a maioria dos componentes dos polímeros estudados têm β -D-configuração, muito embora indique também a possibilidade da presença de unidades com α -D-configuração. As determinações enzimáticas com glucose oxidase, galactose oxidase e L-fucose desidrogenase permitiram excluir, nas estruturas dos polissacarídeos estudados, a presença de L-enantiômeros. Além disso, a análise dos derivados 2-octil glicosídeos acetilados obtidos dos produtos de hidrólise dos polissacarídeos (Figura 3), não apresentou o pico com T=6,96, característico dos 2-octil glicosídeos acetilados da L-galactose (Figura 4).

Ultracentrifugação dos polissacarídeos: A medida da velocidade de sedimentação constitui um dos mais importantes usos da ultracentrífuga. Em um único experimento, que requer apenas alguns miligramas da amostra e muito pouco tempo, informações extremamente importantes podem ser obtidas a respeito da estrutura química investigada. A presença de macromoléculas pode ser detectada, os coeficientes de sedimentação determinados e o tamanho da molécula estimado, assim como a heterogeneidade molecular e a quantidade relativa dos componentes na amostra determinadas.

TABELA I

Análise por g.l.c. dos produtos da hidrólise ácida dos polímeros

Produto *	Mole % nos polissacarídeos		
	T ₀	T ₁₀	T ₁₅
Galactitol	75,8	84,0	88,7
Glucitol	24,2	16,0	11,3

*Coluna (c), isoterma a 190°

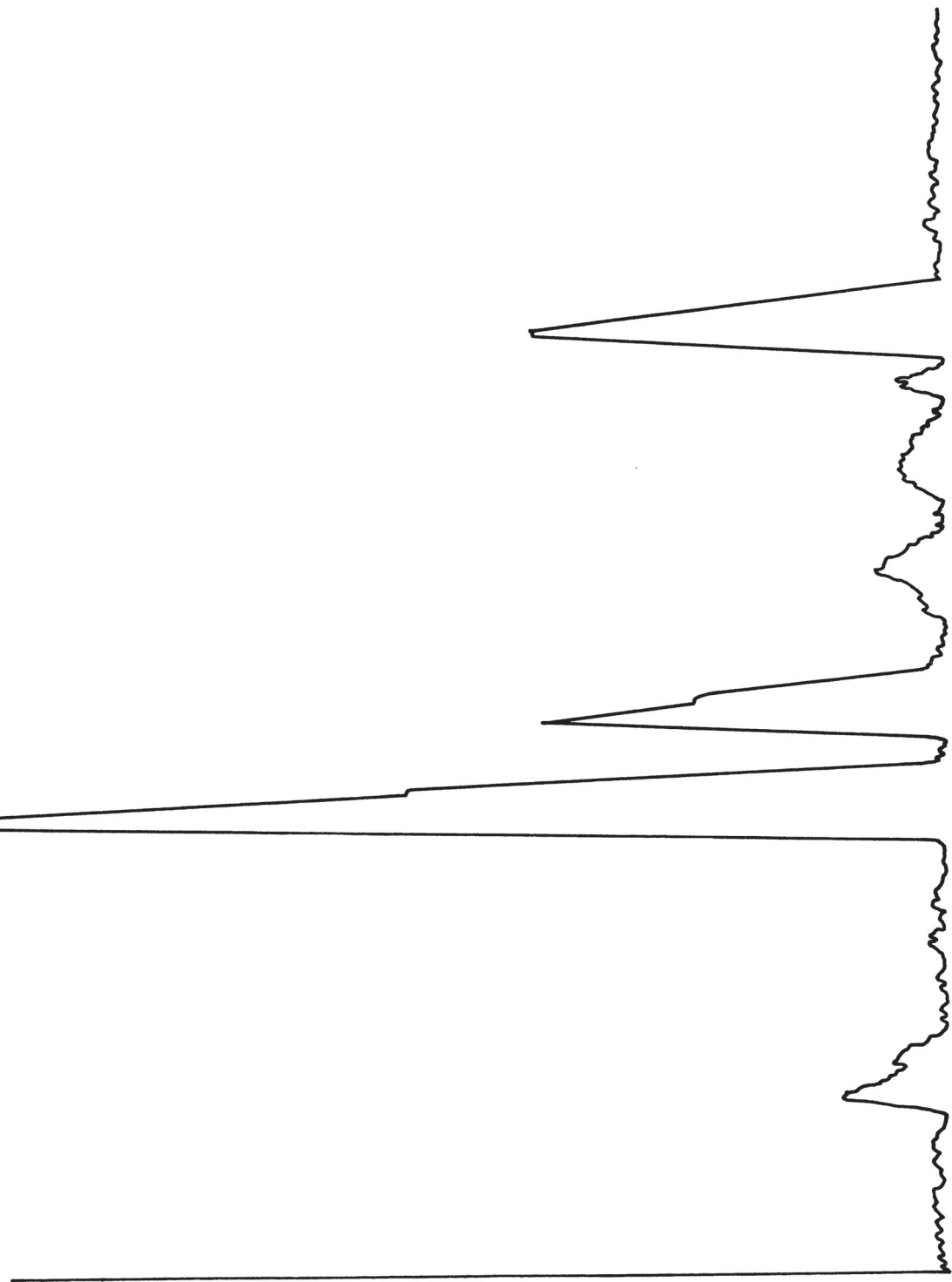


Figura 3 - g.l.c. dos (-)-2-óctil galactosídeos acetilados obtidos do hidrolisado do polissacarídeo T₀. Coluna de vidro (25m x 0,25mm) de SP-1000 a 230°C. Tempos de retenção relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol.

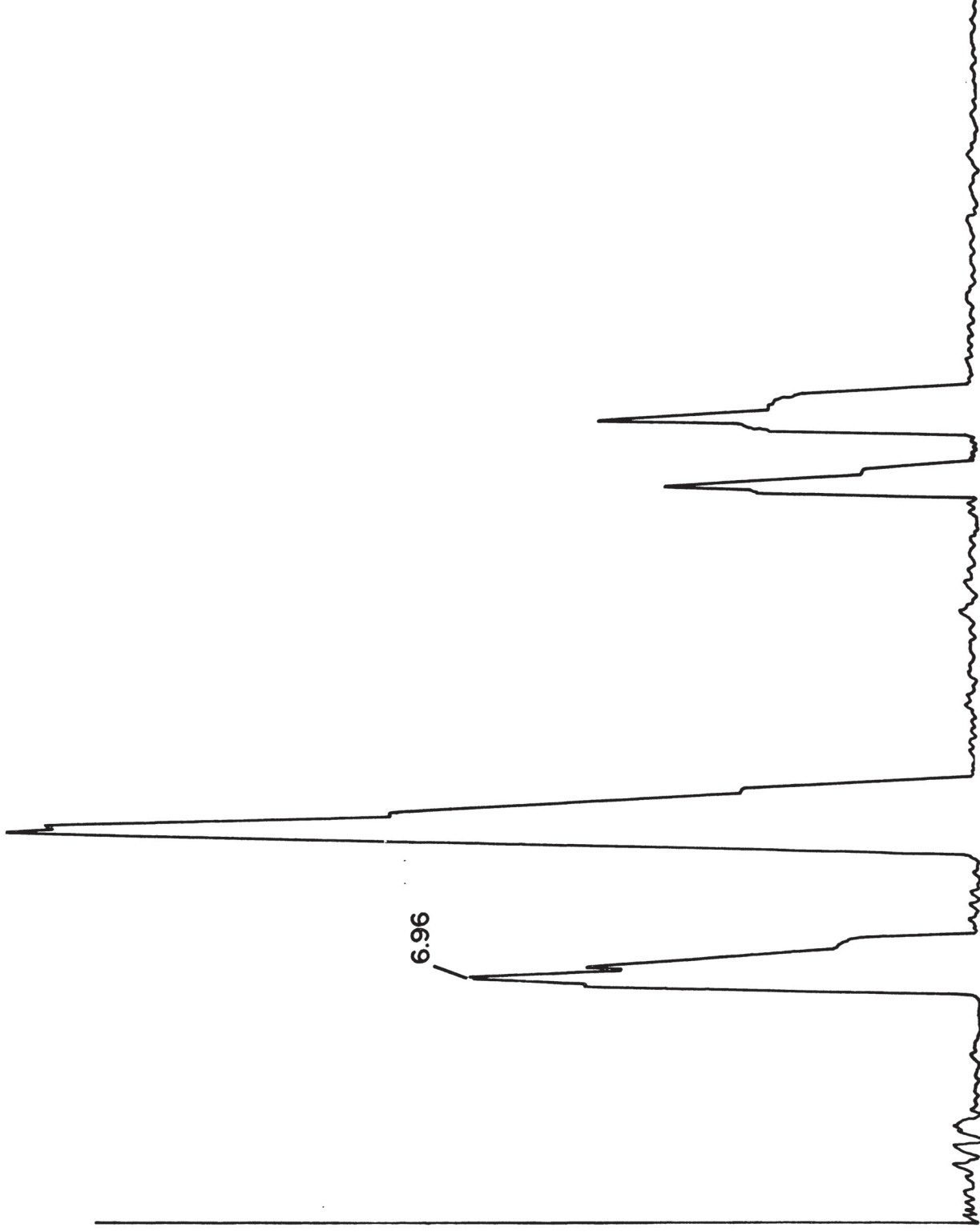


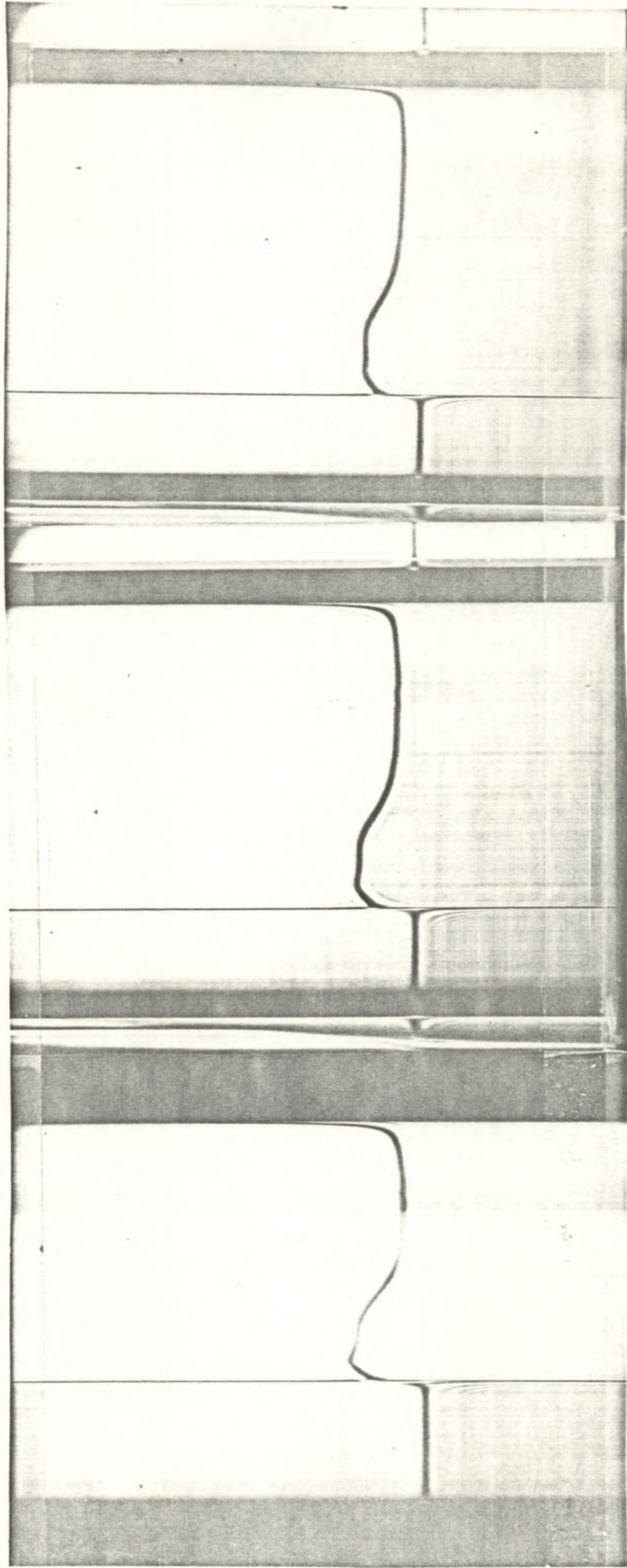
Figura 4 - g.l.c. dos (-)-2-octil galactosídeos acetilados da L-galactose.

Coluna de vidro (25m x 0,25mm) de SP-1000 a 230°C. Tempos de retenção relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol.

O princípio do método é muito simples: as moléculas em solução são submetidas a altas fôrças centrífugas e suas velocidades de sedimentação medidas. Desde que moléculas individuais não podem ser diretamente observadas, a velocidade da média de todas as moléculas é medida, determinando-se sua posição na célula da centrifuga em função do tempo. A população de moléculas evidencia-se como um pico cuja ordenada máxima é uma indicação bastante precisa de sua posição.

Considerações sobre a técnica utilizada na determinação dos coeficientes de sedimentação dos polissacarídeos estudados já foram feitas em Materiais e Métodos. Em geral, se for observado um único pico, que seja simétrico e persistente em sua trajetória ao longo da célula, o soluto pode ser considerado homogêneo em ultracentrifugação. Isso não significa, necessariamente, que o soluto seja homogêneo por outros critérios. Sabe-se que algumas misturas de macromoléculas podem dar origem a um único pico quando submetidas a ultracentrifugação. No entanto, se este pico se alargar rapidamente em sua passagem pela célula da ultracentrífuga muito provavelmente o soluto é polidisperso. Geralmente, cada pico corresponde à população molecular de um dos componentes da mistura e, por isso, os coeficientes de sedimentação podem ser determinados para cada um.

Como pode ser visto na Figura 5, cada um dos polissacarídeos investigados (T_0 , T_{10} e T_{15}) contém, pelo menos, dois componentes, um com 10S e outro com 40S em contraste com o observado na análise por eletroforese, quando então os polímeros exibiram apenas uma banda, e na cromatografia por peneiras moleculares, que evidenciaram apenas um componente para T_0 , T_{10} e T_{15} . Considerando que os picos se alargam rapidamente, ainda que os coeficientes de sedimentação sejam bastante altos, existe a pos



(A)

(B)

(C)

Figura 5 - Padrões de ultracentrifugação de T_0 (A), T_{10} (B) e T_{15} (C) obtidos após 16 min. a 30.000 r.p.m.

sibilidade da presença de mais do que dois componentes em cada um dos polissacarídeos estudados.

Picos muito largos tornam difíceis medições precisas pois dificultam a localização das ordenadas máximas. O cálculo do S envolve o gráfico de $\ln_e r$ (distância radial) contra o tempo; a obtenção de uma linha reta indica medida consistente, e isso foi obtido para o componente 40S dos polímeros T_0 , T_{10} e T_{15} . No entanto, para o componente com 10S o gráfico apresentou pequenas inflexões, sugerindo a possibilidade da existência de dois componentes.

Pode-se observar ainda na Figura 5 que não há diferença significativa nos valores de S das amostras, principalmente do componente mais rápido. No entanto, uma diferença quantitativa apreciável se observa no componente mais lento, que sendo mais abundante no polímero T_0 , tem sua presença diminuída em T_{10} e mais ainda em T_{15} .

Espectroscopia de p.m.r. : Na análise por p.m.r. (Figura 6) - nenhum sinal de ressonância foi observado que permitisse supor a presença de ácido pirúvico (δ 1,99-2,09 ppm)⁶⁷, de grupos acetil (δ 2,70 ppm no espectro do 6-acetil β -galactopiranosídeo), nem de L-fucose (sinal dos protons de C-6), fato que diferencia esses polímeros daqueles isolados de outros moluscos do mesmo gênero¹⁷⁻¹⁹.

Metilação, oxidação pelo periodato e degradação de Smith dos polissacarídeos: Os estudos de metilação revelam a presença de D-glucose, exclusivamente na forma de D-glucopiranosose, nas extremidades não redutoras dos polímeros T_0 , T_{10} e T_{15} . As unidades de D-glucopiranosose estão, portanto, ligadas ao núcleo da galactana formando uma

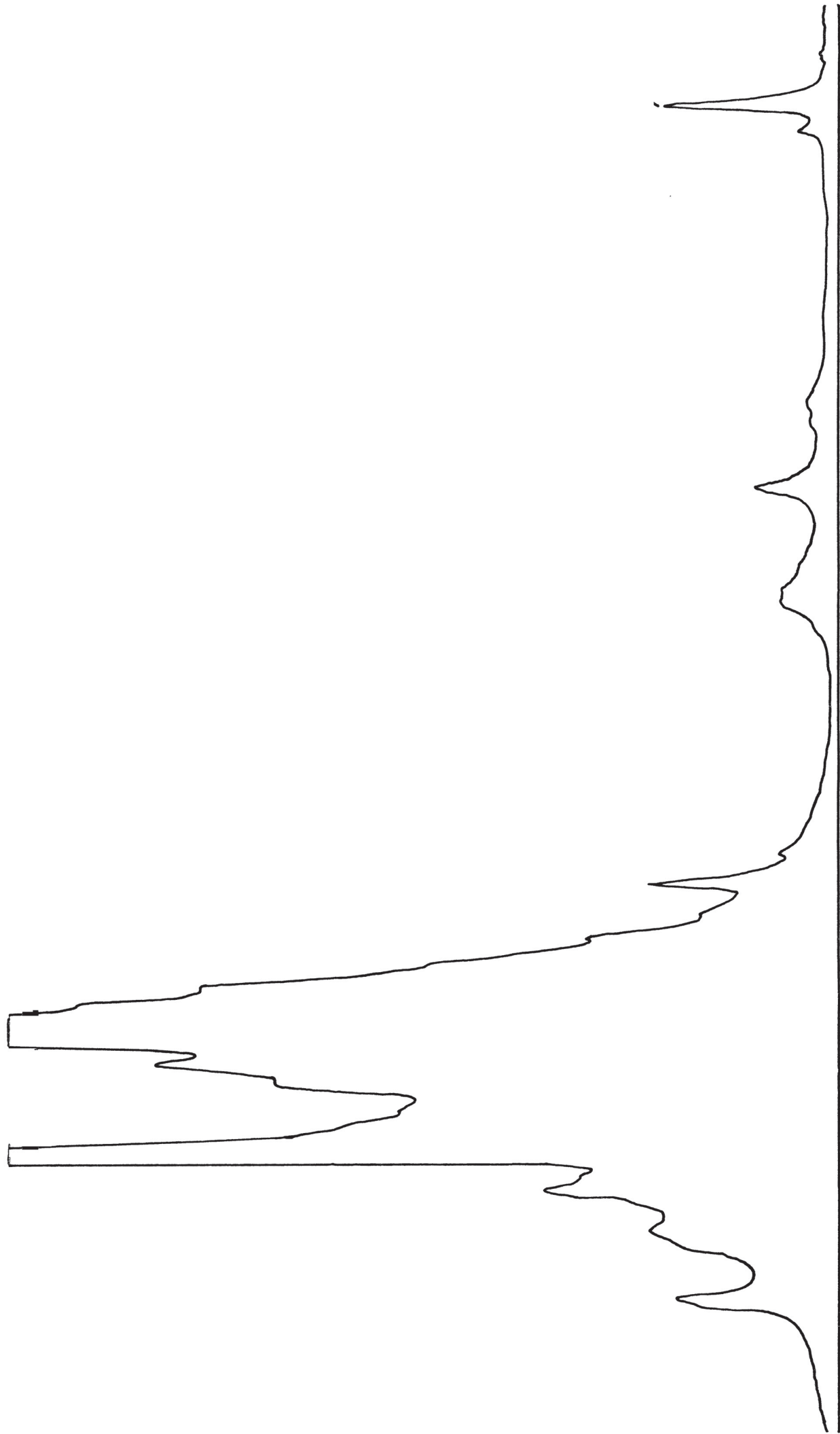


Figura 6 - Espectro de p.m.r. de T_0 obtidos em D_2O a $70^\circ C$. Os deslocamentos químicos (δ) são relativos ao do TMS externo.

glucogalactana ainda não relatada, em pelo menos um dos componentes das frações. De fato, a análise quantitativa por g.l.c. dos produtos da metanólise dos polissacarídeos metilados (na forma de alditol acetatos parcialmente metilados), revelou que o polímero T_0 é composto de 29,0 mole% de unidades de D-glucopiranosose (m/e 45, 117, 161, 205) e 20,0 mole% de unidades de D-galactopiranosose (m/e 45, 117, 161, 205) nas extremidades não redutoras da molécula; 7,0 mole% de unidades 4-O-substituídas (m/e 45, 117, 161, 233); 5,0 mole% de unidades 3,4-di-O-substituídas (m/e 45, 117); e 40,0 mole% de unidades 3,6-di-O-substituídas (m/e 117, 189) (Tabela III). Os dados de consumo de periodato (0,9 mol/mol de hexose anidra) (Figura 7), ácido fórmico liberado (0,40 mol/mol de hexose anidra) e degradação de Smith (Tabela II) estão de acordo com os dados de metilação obtidos para o polímero T_0 .

Estes dados permitem concluir que existem 40,0 mole% de unidades que consomem 2 mole de periodato/mol de hexose anidra e liberam 1 mol de ácido fórmico/mol de hexose anidra, tais como unidades apresentando ligações glicosídicas do tipo (1→6) (cadeias lineares) e (ou) unidades terminais não redutoras; 10,0 mole% de unidades que, embora consumindo periodato, não liberam ácido fórmico, tais como unidades apresentando ligações glicosídicas do tipo (1→2) ou (1→4). A presença de treitol entre os produtos da degradação de Smith de T_0 , caracteriza a existência de ligação glicosídica do tipo (1→4) no polissacarídeo. Além disso, evidencia-se que há 50,0 mole% de unidades não suscetíveis à oxidação com periodato, tais como unidades apresentando ligações glicosídicas do tipo (1→3) ou unidades piranosídicas com ramificações nos carbonos C-3 e C-6, C-2 e C-3, C-3 e C-4, e C-2 e C-4 (pontos de ramificação).

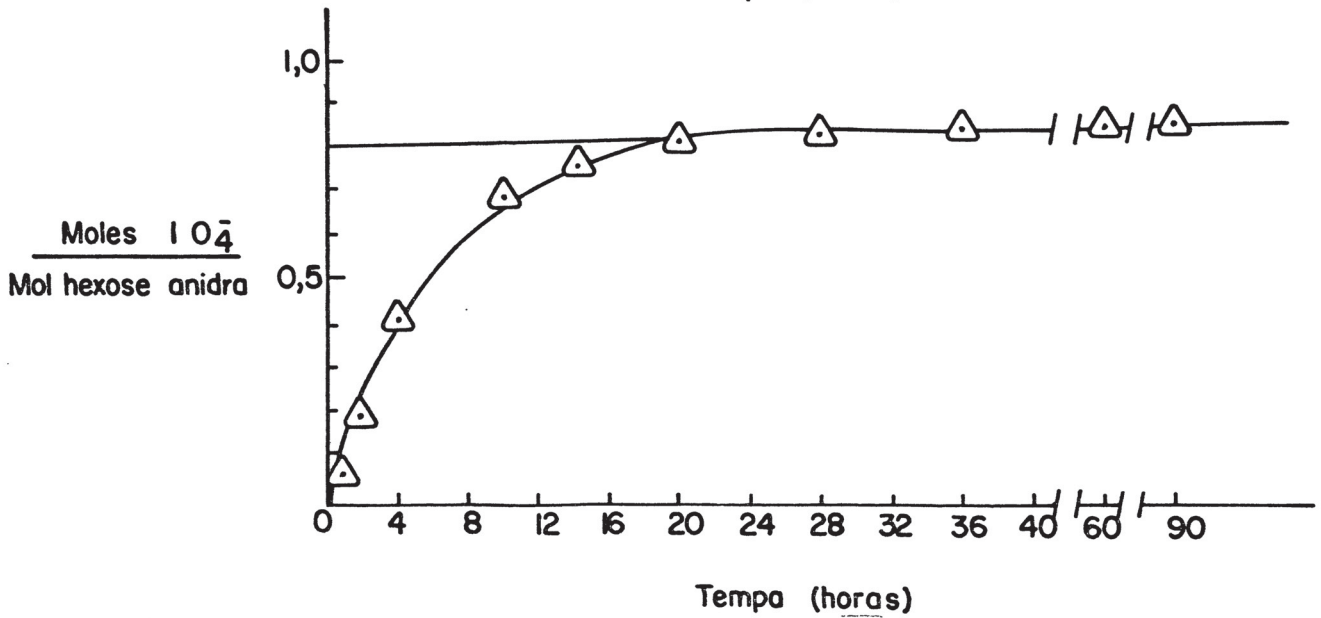
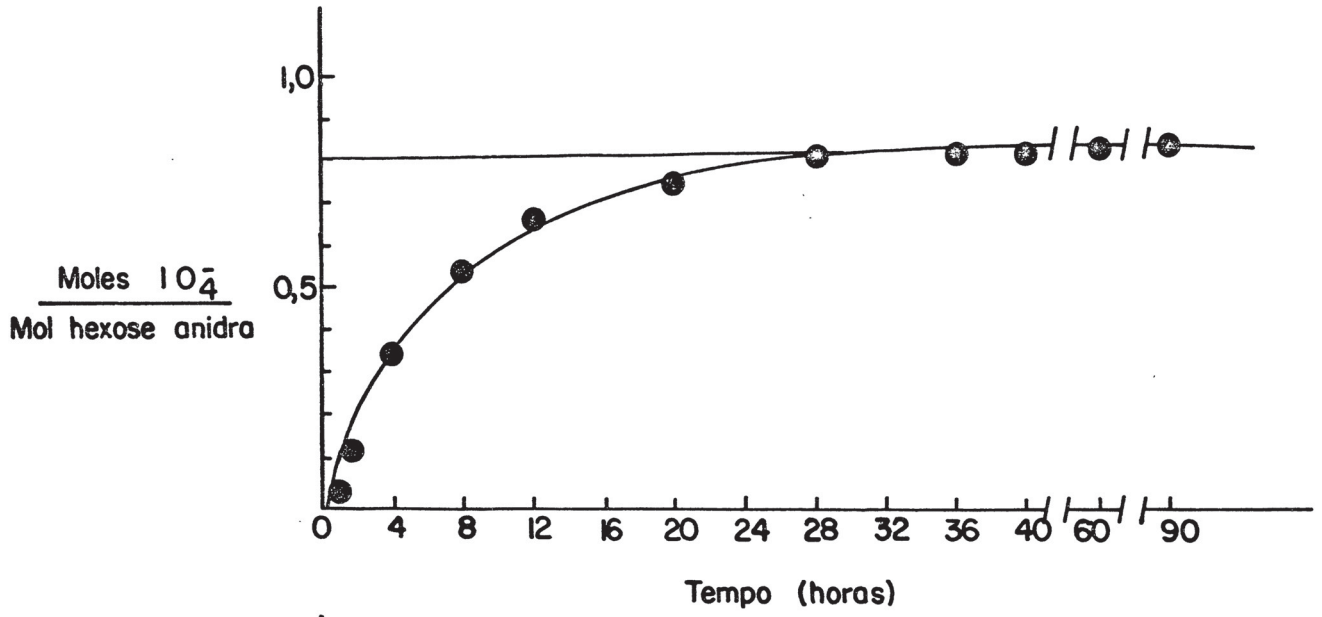
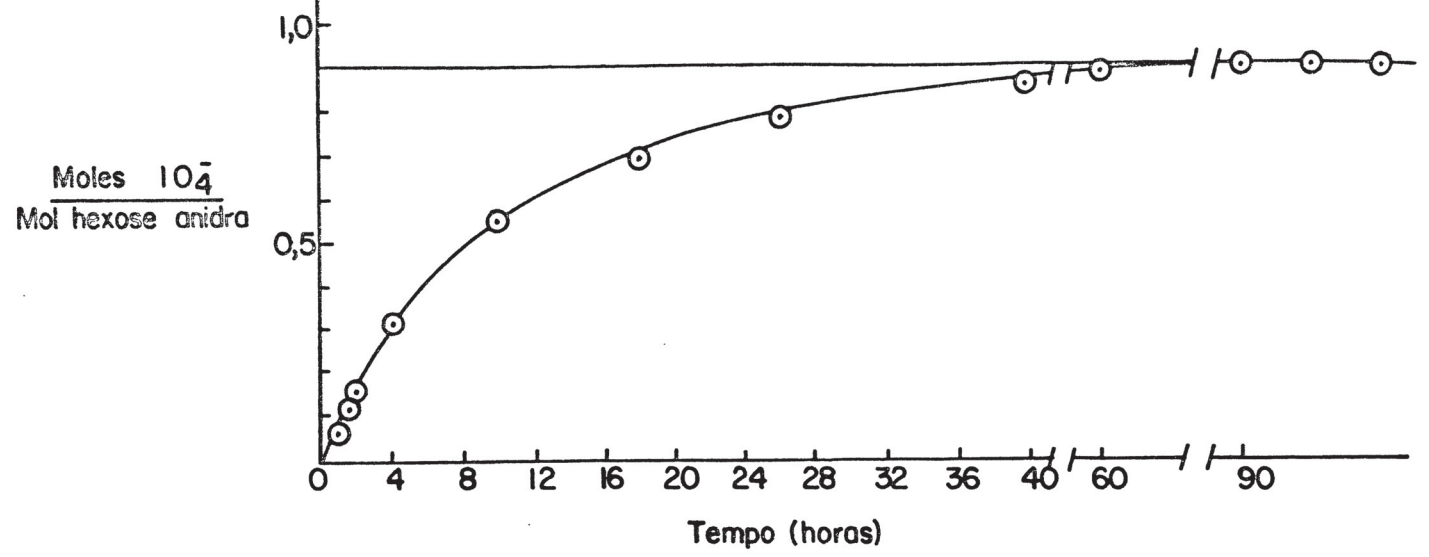


Figura 7 - Curvas de oxidação com meta-periodato de T_0 (○), T_{10} (●) e T_{15} (△).

TABELA II

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

Alditol acetato*	R ^{**} Gal	mM% nos polissacarídeos		
		T ₀	T ₁₀	T ₁₅
Glicerol-tri	1,54	48,5	49,5	44,4
Treitol-tetra	1,30	9,6	11,0	10,2
Galactitol-hexa	1,00	37,4	35,3	40,9
Glucitol-hexa	1,13	4,5	3,9	4,5

* Coluna (c) com programação de temperatura (130°-190°C; 4°C / min.) e arabinitol pentacetato (10 µg) como referência quantitativa interna.

** Obtidos por cromatografia em papel, solvente (d)

TABELA III

Análise por g.l.c. dos produtos derivados dos polissacarídeos metilados*

Alditol acetato parcialmente metilado**	Moles % nos polissacarídeos			
	T***	T _O	T ₁₀	T ₁₅
2,3,4,6-Tetra-O-metil-D-gluc	1,00	29,0	15,0	12,0
2,3,4,6-Tetra-O-metil-D-gal	1,25	20,0	23,0	30,0
2,4,6-Tri-O-metil-D-gal	2,03	—	4,5	2,0
2,3,6-Tri-O-metil-D-gal	2,16	7,0	11,0	8,0
2,3,4-Tri-O-metil-D-gal	2,71	—	4,5	2,0
2,6-Di-O-metil-D-gal	3,09	5,0	7,0	6,0
2,4-Di-O-metil-D-gal	4,91	40,0	35,0	40,0

* Na forma de alditol acetatos parcialmente metilados

** Coluna (a)

*** Coluna (c). Tempos de retenção (T) relativos ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosídeo. 9

Por outro lado, o polímero T₁₀ apresentou 15,0 mole% de unidades de D-glucopiranosose e 23,0mole% de unidades de D-galactopiranosose nas extremidades não redutoras da molécula; 4,5 mole% de unidade 6-O-substituídas (m/e 73, 117, 161, 205, 277); 11,0 mole% de unidades 4-O-substituídas; 4,5mole% de unidades de 3-O-substituídas (m/e 73, 117, 189, 233, 305); 7,0mole% de unidades 3,4-di-O-substituídas e 35,0mole% de unidades 3,6-di-O-substituídas (Tabela III). Os dados de consumo de periodato (0,8mol/mol de hexose anidra) (Figura 7), ácido fórmico liberado (0,36 mol/mol de hexose anidra) e degradação de Smith (Tabela II) estão de acordo também com dados de metilação, e permitem concluir que existem 36,0mole% de unidades que consomem 2 mole de periodato/mol de hexose anidra e liberam 1 mol de ácido fórmico, tais como as unidades que apresentam ligações glicosídicas do tipo (1→6) (cadeias lineares) e (ou) unidades terminais não redutoras; 8,0mole% de unidades que consomem periodato mas não liberam ácido fórmico, tais como aquelas unidades que apresentam ligações glicosídicas do tipo (1→4) ou (1→2), e 56,0mole% de unidades não suscetíveis à oxidação pelo periodato, tais como unidades que apresentam ligações glicosídicas do tipo (1→3) ou unidades piranosídicas com ramificações nos carbonos C-3 e C-6, C-2 e C-3, C-3 e C-4, e C-2 e C-4 (pontos de ramificação).

O polímero T₁₅ apresentou, pelos dados de metilação, 12,0mole% de unidades de D-glucopiranosose e 30,0mole% de unidades de D-galactopiranosose nas extremidades não redutoras da molécula; 8,0mole% de unidades 4-O-substituídas; 2,0mole% de unidades 6-O-substituídas; 2,0mole% de unidades 3-O-substituídas; 6,0mole% de unidades 3,4-di-O-substituídas e 40,0mole% de unidades 3,6-di-O substituídas (Tabela III). Os dados de consumo de periodato (0,8mol/mol de hexose anidra) (Figura 7), ácido fórmico

mico liberado (0,36 mol/mol de hexose anidra) e degradação de Smith (Tabela II) concordam com os dados de metilação. Esses dados permitem concluir que existem 36,0 mole % de unidades que consomem 2 mole de periodato/mol de hexose anidra e liberam 1 mol de ácido fórmico/mol de hexose anidra, tais como as unidades que apresentam ligações glicosídicas do tipo (1→6) e (ou) unidades terminais não redutoras; 8,0 mole% de unidades que consumindo periodato não liberam ácido fórmico, como aquelas que apresentam ligações glicosídicas do tipo (1→4) ou (1→2) e 56,0 mole% de unidades não suscetíveis à oxidação pelo periodato, tais como as unidades que apresentam ligações glicosídicas do tipo (1→3) ou unidades piranosídicas com ramificações nos carbonos C-3 e C-6, C-2 e C-3, C-3 e C-4, e C-2 e C-4 que constituem os pontos de ramificação da molécula.

A presença de treitol tetracetato nos produtos da degradação de Smith dos polímeros confirma a presença de ligação glicosídica do tipo (1→4) nas estruturas dos polissacarídeos, mesmo considerando-se a dificuldade de substituição em OH-4 que é axial na D-galactose⁶⁸. No entanto, os espectros de ¹³C-n.m.r. (ver adiante) indicam que as unidades galactopiranosídicas 3,4-di-O-substituídas, evidenciadas pela caracterização do 2,6-di-O-metil galactitol acetato (Tabela III) na análise dos produtos dos polissacarídeos metilados, estão ausentes e que, de fato, ocorreu metilação insuficiente. Se essas unidades di-O-substituídas estivessem presentes, haveria mais do que um sinal de ressonância em cada região correspondente ao C-3-O-substituído (δ_C 83,2ppm) e ao C-4 O-substituído (δ_C 78,5ppm) devido ao efeito da β -substituição (efeito- β). A ausência do derivado 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil-D-galactopiranosídeo na mistura dos O-metil-alditol acetatos (Tabela III) permite excluir, nas estruturas dos polímeros, a presença de ligação glicosídica do tipo (1→2).

Um fato importante é a presença de D-glucose nas extremidades não redutoras das moléculas dos polissacarídeos, o que não havia ainda sido relatado em polissacarídeos isolados de moluscos. Ao analisarmos, comparativamente, as estruturas de T_0 , T_{10} e T_{15} poderemos verificar que a percentagem das unidades de D-glucopiranosose diminui à medida que o tempo de desenvolvimento embrionário evolui. Deve-se notar ainda que, paralelamente à queda do número de unidades de D-glucopiranosose, existe o aparecimento de unidades tri-O-substituídas que são, provavelmente, provenientes das unidades di-substituídas no polímero original. Verifica-se ainda um aumento relativo do número de unidades de D-galactopiranosose presentes nas extremidades não redutoras das moléculas. Estes fatos nos levam a crêr que há um consumo das unidades de D-glucopiranosose por parte do embrião do molusco, muito provavelmente com objetivo energético. Os dados atuais evidenciam que as frações 10S contêm a glucogalactana e que o equipamento enzimático do embrião do molusco libera a D-glucose existente nas extremidades não redutoras dos polímeros. Este fato é corroborado pela diminuição do número de unidades de D-glucose nos polímeros T_{10} e T_{15} . A fração 40S, que permanece, aparentemente, constante durante o desenvolvimento do embrião é, possivelmente, um polímero de D-galactopiranosose e seu papel na massa de ovos não fica esclarecido.

Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r dos polissacarídeos: O objetivo dos estudos de ^{13}C -n.m.r. em T_0 , T_{10} e T_{15} é confirmar suas estruturas propostas com base nos dados de metilação, da degradação de Smith e no consumo de periodato, que demonstram serem as unidades de D-glucopiranosose preferencialmente consumidas pelo embrião do molusco (Tabela III). Além disso, o espectro de ^{13}C serve para confirmar que a maioria das unidades componentes dos polímeros

estudados têm β -configuração, o que também é sugerido pelas rotações específicas dos polímeros (T_0 , $[\alpha]_D^{25} +43,8^\circ$ (c,l em água); T_{10} , $[\alpha]_D^{25} +41,2^\circ$ (c,l em água) e T_{15} , $[\alpha]_D^{25} +40,8^\circ$ (c,l em água).

As ressonâncias de C-1 das formas piranosídicas da glucose, xilose, galactose, arabinose, metil glucosídeo e metil xilosídeo são sensíveis às configurações anoméricas⁶⁹. O sinal de C-1 do metil α -D-glucopiranosídeo (δ_C 100,3ppm) está em campo mais alto do que o sinal de C-1 do anômero β (δ_C 104,3ppm) e o sinal de C-1 do metil α -D-galactopiranosídeo (δ_C 100,5ppm) está em campo mais alto do que o sinal de C-1 do anômero β (δ_C 104,9ppm), sendo os experimentos realizados em D_2O a $33^\circ C$ ⁶⁹. Esses sinais, por outro lado, diferem dos sinais de C-1 do metil α -D-galactofuranosídeo (δ_C 103,1ppm) e do seu anômero β (δ_C 109,2ppm)⁷⁰.

Nos espectros de ^{13}C -n.m.r dos polímeros T_0 , T_{10} e T_{15} (Figura 8), é bastante provável que os sinais em 105,6ppm; 105,3ppm; 105,1ppm e 104,4ppm (obtidos a $33^\circ C$) sejam provenientes de unidades β -D-galactopiranosídicas e (ou) β -D-glucopiranosídicas. A confirmação dessas possibilidades, no entanto, pode ser obtida comparando-se os valores dos deslocamentos químicos dos sinais de C-1 dos polissacarídeos estudados com os deslocamentos químicos dos sinais de C-1 de vários galactobiosídeos⁷¹ (Tabela IV). As rotações ópticas polímeros (T_0 , $[\alpha]_D^{25} +43,8^\circ$ (c,l em água); T_{10} , $[\alpha]_D^{25} +41,2^\circ$ (c,l em água) e T_{15} , $[\alpha]_D^{25} +40,8^\circ$ (c,l em água) são muito mais altas do que as rotações ópticas das β -D-galactanas ($[\alpha]_D^{25} + 21^\circ$) o que sugere a presença de unidades de α -D-galactopiranosose e (ou) α -D-glucopiranosose. Este fato foi confirmado pela análise do espectro de ^{13}C -n.m.r de T_0 (Figura 8) o qual contém um sinal de C-1 a δ_C 101,0ppm, a campo mais alto do que os sinais de C-1 a δ_C 105,3ppm, 105,0ppm e 104,0ppm os quais correspondem a unidade β -hexopiranosídicas. O sinal a δ_C 101,0ppm é proveniente de C-1 das unidades α -D-glucopiranosídicas já que

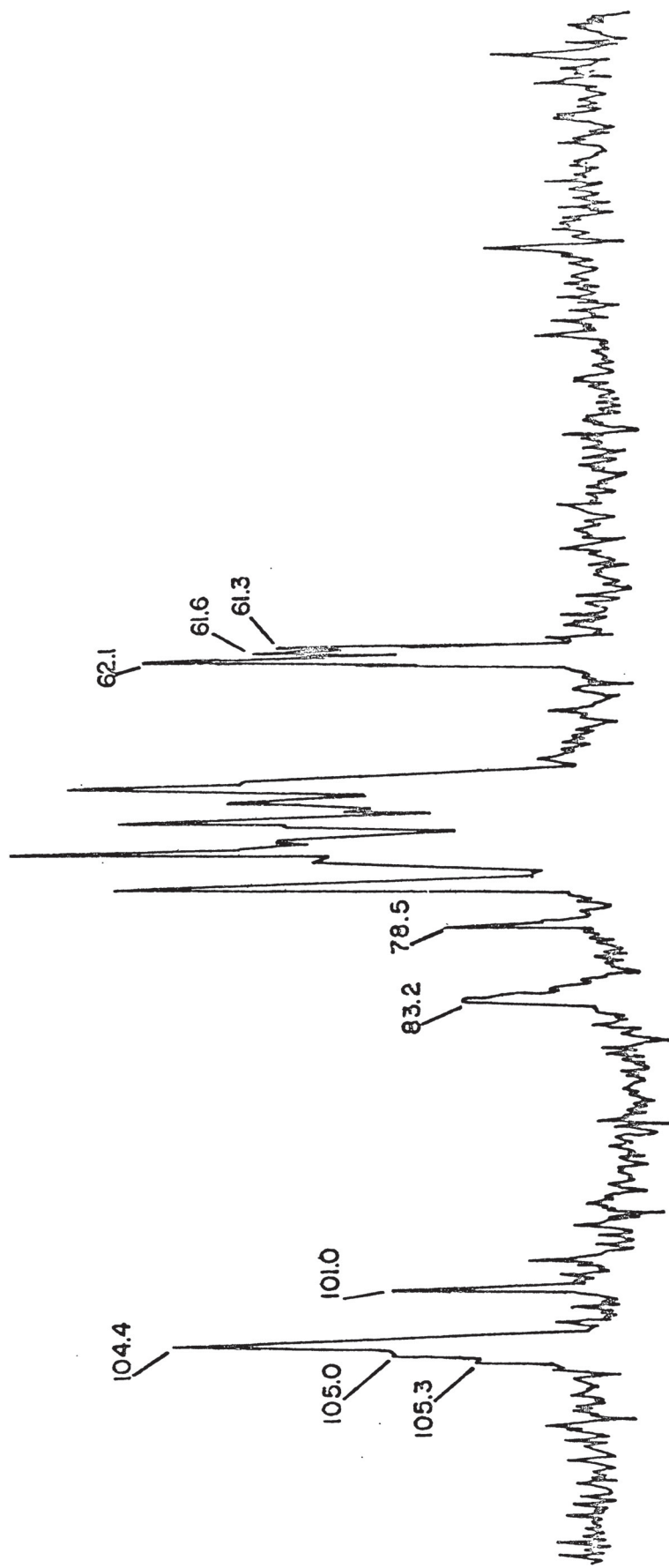


Figura 8 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. T_0 obtido em D_2O a 70°C . Os valores assinalados são os deslocamentos químicos expressos em δ_c (ppm) relativos ao TMS externo.

a hidrólise ácida parcial do polissacarídeo dá origem a 4-O- α -D-glucopiranosil- α , β -D-galactose, estrutura confirmada por estudos de metilação e pela sua alta rotação específica ($[\alpha]_D^{25} + 130^\circ$). O isolamento deste dissacarídeo aliado ao fato de que a degradação de Smith do polissacarídeo, usando-se condições de hidrólise suaves, demonstrou a presença de treitol (além do glicérol) evidencia que as extremidades não redutoras da molécula são constituídas da estrutura α -D-Glucp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp. A presença de β -configuração na unidade galactopiranosídica é confirmada já que o espectro de ^{13}C -n.m.r do β -D-anômero do dissacarídeo apresenta um sinal de C-4 a $\delta_{\text{C}} 78,7\text{ppm}$ o qual corresponde ao sinal com $\delta_{\text{C}} 78,5\text{ppm}$ no espectro do polissacarídeo original. Uma correspondência entre os sinais de C-1 foi observada no espectro do polissacarídeo ($\delta_{\text{C}} 101,0\text{ppm}$) e no do dissacarídeo ($\delta_{\text{C}} 101,1\text{ppm}$) (Figura 9). Convém ressaltar que o polissacarídeo não dialisado obtido da degradação controlada de Smith, quando observado por ^{13}C -n.m.r, não mais apresentou os sinais de C-1 das unidades α -D-glucopiranosídicas nem o de C-4 das unidades de galactose 4-O-substituídas (Figura 10).

Os espectros de ^{13}C -n.m.r de T_0 , T_{10} e T_{15} mostram dois sinais que podem ser atribuídos a carbonos O-substituídos, ou seja, um a $\delta_{\text{C}} 83,2\text{ppm}$ (maior) e outro a $\delta_{\text{C}} 78,5\text{ppm}$ (menor) e que estão em campo mais baixo do que os sinais de C-2, C-3, C-4 e C-5 das unidades de galactopiranosose e glucopiranosose⁷⁰. Para que possamos concluir algo, é necessário assumir-mos que os deslocamentos químicos dos sinais de ressonância dos átomos de carbono dos polissacarídeos são iguais àqueles dos átomos de carbono dos monossacarídeos componentes e que possuam a configuração apropriada, e que na O-glicosilação acontece um forte deslocamento do sinal do carbono substituído para campo mais baixo (efeito -

TABELA IV

Atribuição dos sinais de ^{13}C -n.m.r. de alguns galactobiosídeos

Dissacarídeo	Deslocamento químico, δ_{C} em ppm($\text{D}_2\text{O}; 33^\circ\text{C}$) *	
	C-1	Carbono O-glicosilado
β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-Me β -D-Galp	104,3 ou 103,4	79,7 (C-2)
β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-Me β -D-Galp	105,2	83,4 (C-3)
β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-Me β -D-Galp	105,3	78,3 (C-4)
β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-Me β -D-Galp	104,3	—
α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-Me β -D-Galp	99,2	77,1 (C-2)
α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-Me β -D-Galp	96,6	78,9 (C-3)
α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-Me β -D-Galp	101,4	78,7 (C-4)
α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-Me β -D-Galp	101,1	—

* Experimentos feitos a 70°C . Os valores aqui apresentados foram corrigidos para 33°C (δ_{C} a 70°C - 0,06 ppm= δ_{C} a 33°C).

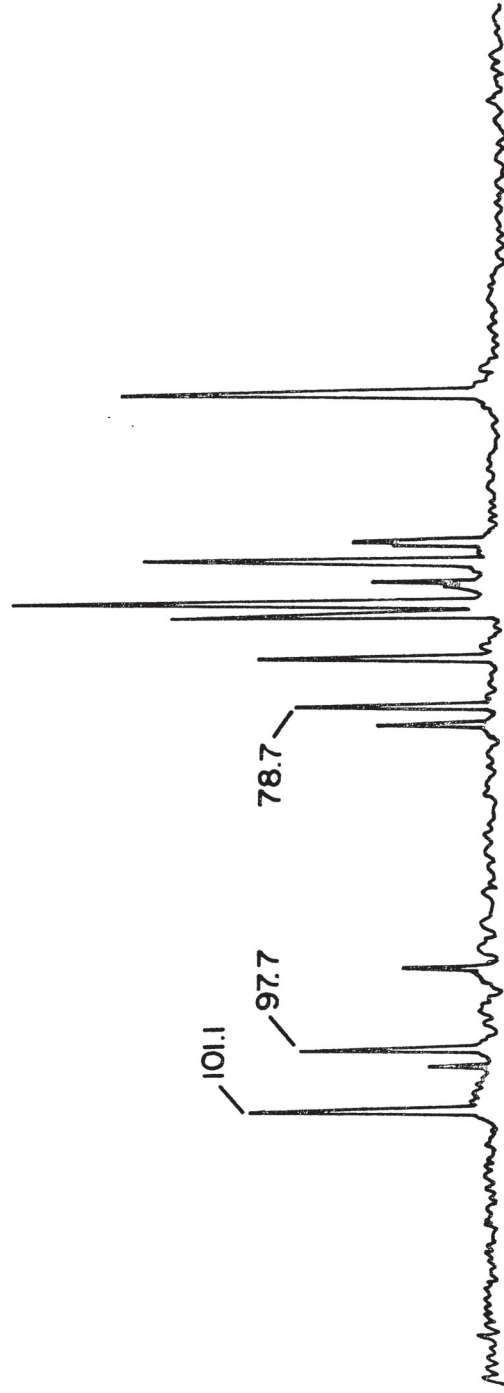


Figura 9 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. do dissacarídeo, obtido por hidrólise ácida de T_0 , a 70°C em D_2O . Os valores assinalados são os deslocamentos químicos expressos em δ_c (ppm) relativos ao TMS externo.

$-\alpha)^{69,72}$, fenômeno que é acompanhado por pequeno deslocamento dos sinais dos átomos de carbono adjacentes para campo mais alto (efeito- β)⁷².

Os deslocamentos químicos dos sinais que ocorrem na O-metilação de grupos hidroxila possuem grande semelhança com aqueles que ocorrem na O-glicosilação. Para a O-metilação em sistemas de anéis de seis membros, os deslocamentos do tipo α são da ordem de +7 a +11ppm e os deslocamentos do tipo β são da ordem de -1 a -2ppm, ainda que menores valores tenham sido encontrados^{34,73}. A metilação de um grupo ligado equatorialmente (e)⁷² ou axialmente (a)^{34,74,75} resulta num forte deslocamento do sinal de ressonância do carbono β (-3 a -5ppm) se a ligação do carbono β -oxigênio for axial. DORMAN e ROBERTS²⁹ consideraram que num sistema OM-e OH-a, o deslocamento químico para campo mais alto (-4,5ppm) é devido à disposição "gauche" do grupo metoxil que interage (sem ligação química; efeito- γ ; efeito "gauche") com o átomo de carbono ligado ao substituinte axial.

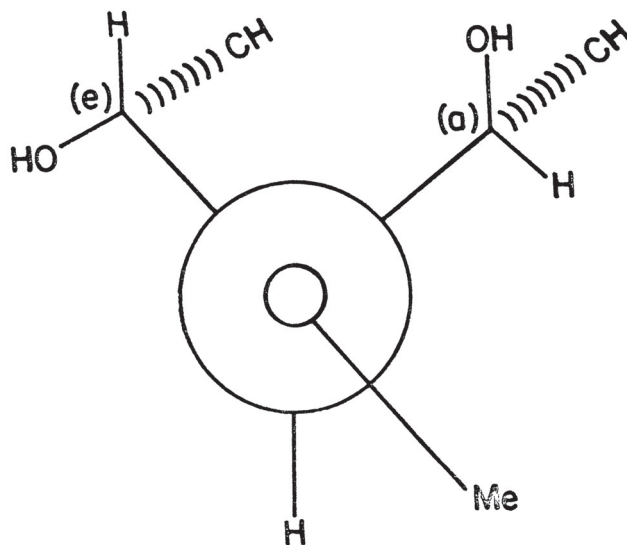




Figura 10 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. de T_0 após degradação controlada de Smith, a 70°C em D_2O . Os valores assinalados são os deslocamentos químicos expressos em δ (ppm) relativos ao do TMS externo.

Portanto, os derivados mono-metilados da galactose podem ser usados como modelos bastante aproximados, e podem possibilitar o reconhecimento dos sinais de ressonância dos carbonos O-substituídos nos espectros dos polissacarídeos T_0 , T_{10} e T_{15} . Com essa finalidade os espectros de ^{13}C -n.m.r. do 2-O, 3-O, 4-O e 6-Ometil galactopiranosídeo foram obtidos. Considerando que os açúcares apresentavam-se em solução como misturas dos anômeros α e β , foi necessário distinguir os sinais de cada componente (Tabela V). Isso foi possível porque cada açúcar estava na forma cristalina de cada um dos isômeros. No caso do derivado 4-O-metil- β -D-galactopiranosose, na forma cristalina, esse foi dissolvido em D_2O e seu espectro de ^{13}C obtido após 15 minutos, porém antes de ter havido a oportunidade de mutarotação. Os sinais do isômero α foram determinados subtraindo-se os sinais do isômero β original dos sinais do 4-O-metil- α , β -D-galactopiranosose obtido após algumas horas de mutarotação. Técnica similar foi usada com o 2-O-metil- β -D-galactopiranosose, 3-O-metil- α -D-galactopiranosose e o 6-O-metil- α -D-galactopiranosose. A percentagem de derivados furanosídicos nas soluções dos derivados 2-O, 3-O, e 6-O-metil é muito pequena e insuficiente para interferir na determinação dos deslocamentos químicos dos sinais dos derivados piranosídicos. A atribuição dos sinais (Tabela V) foi feita tendo-se em conta os deslocamentos químicos dos derivados metilados α e β , como já descrito. No caso do 6-O-metil- α , β -D-galactopiranosose, o sinal de C-6 foi determinado pelo fato de aparecer como um "triplet" no espectro de ^{13}C obtido com "off - resonance decoupling" 76,77,78.

Como pode ser visto na Tabela V, o único sinal que corresponde ao sinal com $\delta_{\text{C}} 83,2\text{ppm}$ dos espectros dos polissacarídeos é o de C-3 do 3-O-metil- β -D-galactose ($\delta_{\text{C}} 83,0\text{ppm}$). O outro sinal a $\delta_{\text{C}} 78,5\text{ppm}$ corresponde ao sinal de ressonância de

TABELA V

Atribuição dos sinais de ^{13}C -n.m.r. de derivados mono-O-metil-D-galactopiranosídeos*

	Deslocamento químico, δ_{C} (33°C)**						
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	O-Me
α -D-Galactopiranosose	93,6	69,8	70,56	70,63	71,70	62,50	-
β -D-Galactopiranosose	97,7	73,3	74,2	70,1	76,3	62,3	-
<u>O-Metil-D-galactopiranosídeos:</u>							
2-O-Metil α -D-galp	90,62 (-2,98)***	78,67 (+8,86)	71,33 (+0,77)	70,33 (-0,3)	-	62,21 (-0,29)	61,26
2-O-Metil β -D-galp	97,27 (-0,43)	82,78 (+9,48)	73,46 (-0,74)	69,84 (-0,26)	76,09 (-0,21)	62,00 (-0,3)	61,26
3-O-Metil α -D-galp	93,13 (-0,47)	68,44 (-1,36)	79,59 (+9,03)	65,56 (-5,07)	71,30 (-0,4)	62,20 (-0,3)	57,11
3-O-Metil β -D-galp	97,41 (-0,29)	71,97 (-1,33)	83,04 (+8,85)	66,21 (-3,89)	75,95 (-0,35)	62,02 (-0,28)	57,32
4-O-Metil α -D-galp	93,41 (-0,19)	69,86 (+0,06)	70,80 (+0,24)	81,02 (+10,40)	71,91 (+0,21)	62,51 -	61,90
4-O-Metil β -D-galp	97,60 (-0,1)	73,38 (+0,08)	74,42 (+0,22)	80,34 (+10,20)	76,46 (+0,16)	62,59 (+0,29)	61,71
6-O-Metil α -D-galp	93,22 (-0,38)	69,46 (-0,34)	70,14 (-0,42)	70,56 (-0,07)	69,34 (-2,36)	72,67 (+10,17)	59,28
6-O-Metil β -D-galp	97,36 (-0,34)	72,92 (-0,38)	74,12 (-0,08)	70,01 (-0,09)	73,76 (-2,54)	72,49 (+10,19)	59,42

* Os espectros de ^{13}C -n.m.r. foram racionalizados com a ajuda dos espectros de α e β -D-galactopiranosose levando-se em conta os deslocamentos α e β que ocorrem na O-metilação.

** Os espectros foram obtidos a 70°C e os valores de δ_{C} corrigidos para 33°C.

*** Os valores de δ_{C} , entre parênteses, representam o deslocamento do sinal de ressonância para campo baixo (+) ou campo alto (-) em relação ao sinal correspondente da α ou β -D-galactopiranosose.

C-4 do 4-O-metil β -D-galactopiranose. No entanto, os deslocamentos químicos dos sinais dos anômeros α e β que ocorrem na O-metililação são diferentes daqueles que ocorrem na O-glicosilação. Os metil-galactobiosídeos, que recentemente tornaram-se disponíveis⁷¹, são padrões muito melhores para a identificação dos tipos de ligações glicosídicas (Tabela IV). Podemos ver que o sinal de ressonância de C-3 do metil 3-O- β -D-galactopiranosil-D- β -galactopiranosídeo (δ_C 84,0, ppm) corresponde ao sinal com δ_C 83,2 ppm encontrado nos espectros dos polissacarídeos estudados. O sinal de ressonância de C-4 do metil 4-O- β -D-galactopiranosil- β -D-galactopiranosídeo (δ 78,3 ppm) também corresponde ao sinal com δ_C 78,5 ppm dos espectros dos polissacarídeos investigados.

Como podemos ver, os deslocamentos químicos do tipo- α que ocorrem na O-metililação diferem um pouco daqueles que acontecem na O-galactosilação. Esse fenômeno pode ser racionalizado da seguinte maneira: sabe-se que os deslocamentos químicos dos sinais de C-1⁷⁹ do iso-propil e do tert-butil- α -D-glucopiranosídeo estão em campo mais alto (-4 e -7 ppm, respectivamente) do que os sinais de C-1 do metil glicosídeo, ocorrência essa inteiramente devida ao efeito entre o grupo metil do aglicon e o centro anomérico. O isopropil α -D-glucopiranosídeo pode existir na forma dos três rotâmeros (1, 2 e 3), devendo-se notar que os dois últimos contribuem para o deslocamento dos sinais de C-1 para campo mais alto pelo fato de haver, nesses casos, uma interação sem ligação, entre o grupo CH_3 e a região de C-1 que, nessa situação, se torna mais blindada ("shielding").

Uma interessante observação é que existem 3 sinais de C-6 nos espectros de T₀, T₁₀ e T₁₅ (com δ_c 61,3ppm; δ_c 61,6 ppm e δ_c 62,1ppm) correspondendo a 3 tipos de unidades piranosídicas. É possível que um desses sinais seja produzido por C-6 de unidades α -D-gluco-piranosídicas (padrão δ_c 61,7ppm).

Os sinais atribuídos a C-1 das unidades α -D-gluco-piranosídicas a δ_c 101,0ppm e o sinal a δ_c 78,5ppm atribuído a C-4 das unidades D-galactopiranosídicas poderiam ser originados por cadeias laterais visto serem muito agudos o que sugere, em ¹³C-n.m.r., grande movimento do segmento da molécula. Por outro lado, a largura maior de certos picos de ressonância nos espectros dos polissacarídeos pode ser devida ao fato de serem provenientes de uma mistura de sinais. Em termos matemáticos, um fenômeno como este pode ser explicado do seguinte modo: na ausência de um campo oscilante de radiofrequência, os spins se alinham em torno do eixo do campo magnético aplicado com as fases ao acaso, de tal modo que não existe magnetização transversa. Quando se aplica um campo de radiofrequência ao sistema, aparece a magnetização transversa, e os momentos magnéticos componentes são polarizados ao longo do eixo do campo. A magnetização decai a zero em função das frequências de Larmor presentes na amostra, e os spins se defasam com uma velocidade expressa pela constante T₂ que é o tempo de relaxamento spin-spin ou transverso ("spin-spin relaxation time").

Essa constante pode variar de acordo com a equação⁸⁰:

$$\frac{1}{T_2} = 0,05 \hbar^2 \gamma_H^2 \gamma_C^2 \tau_{CH}^{-6} n [4\mathcal{J}_C^2 + f(\omega_H - \omega_C) + 3f(\omega_C) + 6f(\omega_H + \omega_C)]$$

Onde $f(\omega) = \mathcal{J}_C^2 / (1 + \omega^2 \mathcal{J}_C^2)$; \hbar = constante de Planck/ 2π ; γ_H e γ_C = constante giromagnéticas para núcleos de próton e ¹³C, respectivamente; τ_{CH} = comprimento da ligação C-H; n=número de pró-

tons ligados ao átomo de carbono; \mathcal{T}_C = "molecular rotational", "correlation time" ; e ω_H e ω_C = frequência de Larmor de protons e ^{13}C , respectivamente.

Portanto, protons presentes em cadeias laterais de um polissacarídeo deverão sofrer um maior movimento devido ao segmento molecular, em contraste com os núcleos da cadeia principal, o que resulta num menor valor para o "correlation time" (\mathcal{T}_C) e num maior valor para T_2 ⁸¹. Ora, desde que T_2 está relacionado com a largura dos picos dos sinais de ressonância, de acordo com a expressão $\nu = 1/\pi T_2^*$, onde $1/T_2^*$ é a soma de $1/T_2$ (velocidade de relaxamento transversal) e $1/T_2^{\dagger}$ (contribuição da defasagem, que é proveniente da perda de homogeneidade do campo magnético), valores mais altos de T_2 e, por sua vez, maior movimento do segmento molecular, resulta em menores larguras dos picos de ressonância.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. José Hazencleve Duarte e Philip Albert James Gorin pela orientação, dedicação e amizade dispensadas.

Ao Dr. Samuel L. MacKenzie, do Prairie Regional Laboratory do National Research Council do Canadá, pela valiosa ajuda na obtenção dos dados de ultracentrifugação.

Ao Sr. Mytosk Mazurek, pelos espectros de NMR, ao Sr. Don Tenaschuk, ao Sr. Lawrence Hogge e demais amigos do Prairie Regional Laboratory, em Saskatoon, Sask., Canadá.

À Dra. Dea Amaral pelas determinações enzimáticas da D-galactose e D-glucose, que quando solicitadas foram prontamente realizadas, e ao Prof. Manoel Francisco Guimarães que, com alto espírito de colaboração, investigou a presença da L-fucose e L-galactose com a L-fucose desidrogenase.

Ao Convênio de Cooperação bilateral CNPq/NRCC, que tornou possível, através de uma bolsa de pesquisador convidado, que parte deste trabalho fosse realizado no Prairie Regional Laboratory, do National Research Council do Canadá, em Saskatoon, Sask., Canadá.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, Diretor do Setor de Ciências Biológicas, pela colaboração na execução deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Alberto T. Petiz, da Universidade Federal de Pelotas, pelo auxílio na obtenção dos moluscos estudados, e ao Sr. José Dias, pelo incansável e permanente cuidado com os mesmos já em nosso laboratório.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica da UFPr que, de uma ou outra forma, colaboraram com este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, projeto nº 5218, e FINEP 380/CT.

Ao Dr. Luiz Alberto Veiga, pelo seu permanente estímulo-tão necessário-um testemunho de fraterna amizade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - HAMMARSTEN, O. Studien über mucin und mucinähnliche
substanzen. Pflüger Arch., 36:373-456, 1885.
- 02 - MAY, F. Beitrag zur des tierischen. Z.Biol., 91:215-220,
1931.
- 03 - MAY, F. Beitrag zur kenntnis des Glycogen und
Galaktogengehalten (Tierisches sinistrin) bei Helix
pomatia. Z.Biol., 92:319-324, 1932.
- 04 - MAY, F. Über den Galaktogengehalt der Eier von Helix
pomatia. Z.Biol., 92:325-330, 1932.
- 05 - MAY, F. Chemical and biological investigation on galactogen.
Z.Biol., 95:277-297, 1934.
- 06 - BALDWIN, E. & BELL, D.J. A preliminary investigation on
galactogen from the albumen glands of Helix pomatia.
J.Chem.Soc., 1461-1465, 1938.
- 07 - BELL, D.J. & 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.
- 08 - MAY, F. & WEINLAND, H. - Derstellung von L-galaktose aus
galaktogen. Z.physiol.Chem., 296:154-166, 1954.

- 09 - MAY, F. & WEINLAND, H. The acid hydrolysis of galactogens. I. Preferential cleavage of L-galactose in relation to D-galactose. Z.physiol.Chem., 305:75-86, 1956.
- 10 - LEONTEIN, K. ; LINDBERG, B. & LÖNNGREN, J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. Carbohydr.Res., 62:359-362, 1978.
- 11 - SCHLUBACH, H. H.; LOOP, W. & SMITH, H. Methylation of galactogen isolated from the whole bodies of snails. Annalen., 532:228-235, 1937.
- 12 - O'COLLA, P. The application of the Barry degradation to snail galactogen. Proc.R.I.A. Sect .B., 55:165-170, 1953.
- 13 - CORREA. B.J.; DMYTRACZENKO, A. & DUARTE, J.H. Structure of a galactogen found in albumen glands of Biomphalaria glabrata. Carbohydr. Res., 3:445-452, 1967.
- 14 - DUARTE, J.H. & JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail Strophocheillus oblongus. Carbohydr.Res., 16:327-335, 1971.
- 15 - DIAZ SEGURA, E.A. & DUARTE, J.H. Methylation studies of the polysacharides resulting from sequential Smith degradation of the galactan from the snail Strephocheillus oblongus. Carbohydr.Res., 52:159-167, 1976.
- 16 - HONDA, N.K & DUARTE, J.H. Estudo estrutural dos polissacari-deos obtidos por hidrólise ácida parcial do galactano isolado de glândula de albúmen de Megalobolimus paranaguensis. Arq.Biol.Tecnol., 21:97-118, 1978.

- 17 - LACOMBE FEIJÓ, M.A. & DUARTE, J.H. Some structural studies on the fucogalactan from egg masses of the snail Ampullarius sp., Carbohydr Res., 44:241-249, 1975.
- 18 - DUARTE, H. S. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1981 (em conclusão).
- 19 - GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M.; DUARTE, H.S. & DUARTE, J.H. The structure of 5-membered acetal groups of pyruvic acid in the D-galactan of the snail Pomacea lineata, Carbohydr. Res. 92: C1-C4, 1981.
- 20 - WEINLAND, H. Über den Galaktogenabbau durch Fermente in vitro, Biochemische Zeitschrift, 324:19-31, 1953.
- 21 - MAY, F. Chemische und biologische Untersuchungen über Galaktogen. Z.Biol., 95:401-430, 1934.
- 22 - MAY, F. Chemische und biologische Untersuchungen über Galaktogen. (Biologischer Teil: Galaktogennachweis bei verschieden Tierklasse und beim Menschen). Z.Biol., 95:614-634, 1934.
- 23 - HORSTMANN, J.H. Der galaktogengehalt der Eier von Lymnea stagnalis warend der embryonalentwicklung. Biochemische Zeitschrift, 328:342-347, 1956.
- 24 - IACOMINI, M. ; DUARTE, H.S.; DUARTE, M.E.R.; DUARTE, G.R. ; FONTANA, J.D. e DUARTE, J.H. Degradation of the egg masses galactan during the embrionary development of the snail Biomphalaria glabrata. Arg.Biol.Tecnol., 23:329-335, 1980.

- 25 - GOUDSMIT, E.M. & RAM, J.L. Preliminary purification of a neurosecretion that stimulates galactogen synthesis in the albumen glands of the land snail Helix pomatia. J.Gen. Physiol., 74:7a-8a, 1979.
- 26 - ALLERHAND, A. Natural-abundance carbon-13 Fourier transform NMR studies of large molecules, Pure Appl.Chem., 41:247-273, 1975.
- 27 - JENNINGS, H.J. & SMITH, I.C.P. Polysaccharide structure using carbon-13 nuclear magnetic resonance. Methods Enzymol., 50 Part c: 39-50, 1978.
- 28 - PERLIN, A.S. Carbon-13 NMR spectroscopy of carbohydrates, International Review of Science, Org.Chem.Ser.27:1-34. 1976.
- 29 - DORMAN, D.E. & ROBERTS, J.D. Nuclear magnetic resonance spectra of some common oligosaccharides, J.Am.Chem.Soc. 93:4463-4472, 1971.
- 30 - USUI, T.; YAMAOKA, N.; MATSUDA, K.; TUZIMURA, K.; SUGIYAMA, H. & SETO, S. ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of glucobioses, glucotrioses and glucans. J.Chem.Soc.Perkin Trans. 1:2425-2432, 1973.
- 31 - COLSON, P.; JARREL, H.C.; LAMBERTS, B.L. & SMITH, I.C.P. Determination by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of the composition of glucans synthesized by enzymes of the cariogenic organism Streptococcus mutants, Carbohydr.Res., 71:265-272, 1979.
- 32 - GORIN, P.A.J. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. Can.J.Chem., 51:2375-2383, 1973.

- 33 - BARRETO-BERGTER, E.M.; TRAVASSOS, L.R. & GORIN, P.A.J.
Chemical structure of the D-galacto-D-mannan component
from hyphae of Aspergillus niger and other Aspergillus
spp., Carbohydr. Res., 86:273-285, 1980.
- 34 - GORIN, P.A.J. Assigment of signals of the carbon-13 magnetic
resonance spectrum of a selected polysaccharide: comments
on methodology. Carbohydr. Res., 39: 3-10, 1975.
- 35 - SHASKOV, A.S.; USOV, A.I.; YAROTSKY, S.V. & RABOVSKI, A.B.
Synthesis and carbon-13 NMR spectra of mono- and dimethyl
ethers of methyl α -D-galactopyranoside. Bioorg.Khim., 4
1489-1494, 1978.
- 36 - DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed
polysaccharides on cellulose acetate. Can.J.Chem., 46:
3079-3084, 1968.
- 37 - GORIN, P.A.J.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. &
TRAVASSOS, L.R. Structure of the D-mannan and D-arabino-
-D-galactan in Crithidia fasciculata: changes in proportion
with age of culture. J.Protozool., 26:473-478, 1979.
- 38 - BARRETO-BERGTER, E.M.; GORIN, P.A.J. & TRAVASSOS, L.R. Cell
constituents of mycelia and conidia of Aspergillus fumiga
tus. Carbohydr. Res., in press
- 39 - LÖNNGREN, J. & PILOTTI, A. Gas-liquid chromatography of
partially methylated alditols as their acetates II. Acta
Chem.Scand., 25:1144-1145, 1971.
- 40 - SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H. & JEANES, A. Quantitative
determination of monosaccharides as their alditol acetates
by gas chromatography. Anal.Chem., 37:1602-1604, 1965.

- 41 - GROB, K. & GROB Jr, K. Isothermal analysis on capillary columns without stream splitting, Journal of Chromatography, 94:53-64, 1974.
- 42 - HOUGH, L. & JONES, J.K.N. Chromatography. 6. Chromatography on paper. In: Whister e Wolfrom. Analysis and preparation of sugars. New York, Academic. p. 21-31, 1962. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 1).
- 43 - TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatography by the use of dipping reagents. Nature (London), 166:444-445, 1950.
- 44 - HOUGH, L.; JONES, J.K.N. & WADMAN, W.H. Quantitative analysis 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 paper chromatography. J.Chem. Soc., 1702-1706, 1950.
- 45 - DUBOIS, M. ; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. Anal.Chem., 28:350-356 , 1952.
- 46 - LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.V.; FARR, R.V. & RANDALL, R.V. Protein measurement with the Folin phenol reagent, J.Biol. Chem., 193:265-275, 1951.
- 47 - STAUB , M.A. Removal of proteins. Sevag Method. Meth. Carbohydr.Chem., 5:5-6, 1965.
- 48 - NEUMULLER, O. & VASSUER, E. The influence of pH on the periodate oxidation of carbohydrates. Arkiv.Kemi, 5:235-245, 1953.

- 49 - BARKER, S.A & SOMERS, P.J. A spectrophotometric method for the determination of formic acid on the periodate oxidation of carbohydrates. Carbohydr.Res., 3:220-224, 1967.
- 50 - ANDERSON, D.M.W. ; GREENWOOD, C. T. ; & HIRST, E. L. Physicochemical studies on starches. Part II-The oxidation of starches by potassium metaperiodate. J.Chem.Soc. , 225-231, 1955.
- 51 - ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R. & SMITH, F. A new procedure for determination of the fine structure of polysaccharides. J.Am.Chem.Soc., 74:4970-4971, 1952.
- 52 - HAMILTON, J.K. & SMITH, F. Reduction of the products of periodate oxidation of carbohydrates. III. The constitution of amylopectin. J.Amer.Chem.Soc., 78:5910-5912, 1956.
- 53 - HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J.Chem.Soc., 107:8-16, 1915.
- 54 - FALCONER, E.J. & ADAMS, G.A. The aldobiouronic acids of hemicellulose B of oat hulls. Can.J.Chem., 34:338-344, 1956.
- 55 - ADAMS, G.A. & BISHOP, C.T. Constitution of an arabinogalactan from maple sap. Can.J.Chem., 38:2380-2386, 1960.
- 56 - HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J.Biochemistry (Tokyo) 55:205-208 , 1964.
- 57 - PARIKH, V.M. & JONES, J.K.N. Cholla gum. I. Structure of the degraded cholla gum. Can.J.Chem., 44:327-333, 1966.

- 58 - BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B. & SVENSSON, S. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols. Acta Chem.Scand., 21:1801-1804, 1967.
- 59 - GORIN, P.A.J.; HASKINS, R.H.; TRAVASSOS, L.R. & MENDONÇA-PREVIATO, L. Further studies on the rhamnomannans and acidic rhamnomannans of Sporothrix schenckii, Carbohydr. Res. 55:21-23, 1977.
- 60 - CHERVENKA, C.H. A manual of methods for analytical ultracentrifuge. Stanford Park, Palo Alto, Cal., 23-27, 1969.
- 61 - DAHLQVIST, A. A determination of maltose and isomaltose activities with a glucose oxidase reagent. Biochem.J. 80: 547-555, 1961.
- 62 - AMARAL, D.; KELLY, F.F. & HORECKER, B.L. Galactose oxidase of Polyporus circinatus. Methods Enzymol., 9:87-92, 1966.
- 63 - NOBEL, M.K. & MADHOSINGH, C. Dactylium dendroides (Bull) Fr. misnamed as Polyporus circinatus Fr., Biochem.Biophys.Res. Commun. 12:146-147, 1963.
- 64 - GUIMARÃES, M.F.; RIGO, L.U. & VEIGA, L.A. Metabolism of 6-deoxyhexoses in Pullularia pullulans. Biochemistry and Genetics of Yeasts, ed. A. Stoppani, M. Bacila and B.L. Horecker. Academic Press, N.Y. 161-170, 1978.
- 65 - PERLIN, A.S. Tetroses. 14. D-Erythrose. Methods Carbohydr. Chem., 1:64-66, 1962.
- 66 - GORIN, P.A.J.; HORITSU, K. & SPENCER, J.F.T. An exocellular mannan, alternately linked 1,3- β and 1,4- β from Rhodotorula glutinis. Can.J.Chem., 43:950-954, 1965.

- 67 - GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M.; DUARTE, H.S.; IACOMINI, M. & DUARTE, J.H. Properties of ^{13}C -n.m.r. spectra of O-(1'-carboxyethylidene) derivatives of methyl β -D-galactopyranoside: models for determination of pyruvic acid ketal structures in polysaccharides. Carbohydr. Res., in press.
- 68 - HAINES, A.H. Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates. Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem., 33:11-109, 1976.
- 69 - HALL, L.D. & JOHNSON, L.F. Chemical studies by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy: some chemical shifts / dependencies of oxygenated derivatives. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 509-510, 1969.
- 70 - GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can. J. Chem., 53:1212-1223, 1975.
- 71 - GORIN, P.A.J. Resultados não publicados.
- 72 - DORMAN, D.E.; ANGYAL, S.J. & ROBERTS, J.D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of some inositols and their O-methylated derivatives. J. Amer. Chem. Soc., 92:1351-1354, 1970.
- 73 - COLSON, P.; SLESSOR, K.N.; JENNINGS, H.J. & SMITH, I.C.P. A carbon-13 nuclear magnetic resonance study of chlorinated and polyol analogs of glucose and related oligomers. Can. J. Chem., 53:1030-1037, 1975.

- 74 - GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. ^{13}C magnetic resonance and structural studies on the mannose-containing polysaccharides of some Pichia and Hansenula spp., Can.J. Microbiol., 18:1709-1715, 1972.
- 75 - BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G. & PETERSON, A.J. β -Methylation shifts from the carbon-13 NMR spectrum of 1,4-O,O-dimethyl-chiro-inositol. Aust.J.Chem., 29:1115-1118, 1976.
- 76 - GAGNAIRE, D.Y. & VIGNON, M.R. Carbon-13 NMR and proton NMR study of dextran and its acetylated and benzylated derivatives. Makromol. Chem., 178:2321-2333, 1977.
- 77 - BASSIEUX, D. ; GAGNAIRE, D. & VIGNON, M.R. Étude par R.M. N^{-13}C et ^1H du (1-6)- β -D-glucane et des oligosaccharides linéaires et cycliques correspondants. Carbohydr.Res., 56:19-33, 1977.
- 78 - GAGNAIRE, D. & VINCENDON, M. Carbon-13 NMR spectra of / lichenine, a terpolymer from glucose; comparison with cellulose and laminarine, the two corresponding glucans. Bull.Soc.Chem., 75:479-482, 1977.
- 79 - KOCH, K.F.; RHOADES, J.A.; HAGAMAN, E.W. & WENKERT, E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral analysis of tobramycin and related antibiotics. J.Amer.Chem.Soc., 96:3300-3305, 1974.
- 80 - KOMOROSKI, R.A.; PEAT, I.R. & LEVY, G.C. Top Carbon-13 NMR Spectrosc., 2:179-267, 1976.
- 81 - GORIN. P.A.J. & MAZUREK, M. Structure-dependent, molecular motion parameters of branched-chain polysaccharides. Carbohydr.Res., 72: C1-C5, 1979.