

ROBERTO PONTAROLO

# Estudo de Polissacarídeos de Placenta Bovina em Diferentes Estágios de Gestação

Tese apresentada à coordenação de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA

1986

ORIENTADOR: DR. MARCO AURELIO LACOMBE FEIJÓ

*Todo campo de estudo que o homem cria é uma silente homenagem a Deus, o Criador de tudo, pois, quando o fazemos, reconhecemos todos o caráter finito da nossa própria mente, em comparação com a infinidade do Universo.*

ONSLow H. WILSON

## AGRADECIMENTOS

— Ao professor Dr. MARCO AURÉLIO LACOMBE FEIJÕ, um justo preito de gratidão, por sua orientação, estímulo, amizade e especialmente, pela sua compreensão e disponibilidade constante.

— À professora Dra. Dêa Amaral pelo incentivo e apoio oferecido na qualidade de coordenadora do Curso de Pós-Gra-duação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

— Ao professor Dr. Philip Albert James Gorin pela sua valiosa colaboração na obtenção dos espectros de ressonância magnética de carbono treze.

— Aos professores Dr. José Hazencleve Duarte e Luiz Car-los Vieira Lopes pelas sugestões e colaborações oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

— Aos professores Dr. João Batista Chaves Corrêa, Dr. Aginaldo José do Nascimento e Dr. José Domingos Fontana, pe-la disponibilidade de seus laboratórios e equipamentos.

— A professora Dra. Glaci T. Zancan, pelas produtivas sugestões oferecidas durante a realização deste trabalho.

— Ao Frigorífico Pinhais (Abatedouro Argus) e especialmente o seu diretor comercial Sr. Darcy Paula Mendes, pelo fornecimento do material biológico utilizado no presente trabalho.

— Ao Dr. João Rides Macedo, médico veterinário, e a Srta. Claudine Micheletto, pelas suas atenções e colaborações dispensadas durante a coleta do material, bem como na determinação da idade dos fetos.

— À Srta. Angela Ritzmann Feijó, pela sua colaboração na confecção dos gráficos apresentados nesta tese.

— À professora Dra. Fany Reicher pela revisão deste trabalho, e pelas valiosas sugestões.

— A todos os professores, pós graduandos e funcionários do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela amizade e colaboração.

— Ao CNPq pelo suporte financeiro.

## S U M Á R I O

LISTA DE TABELAS . . . . .	viii
LISTA DE FIGURAS . . . . .	ix
LISTA DE SIGLAS . . . . .	xi
RESUMO . . . . .	xiii
ABSTRACT . . . . .	xv
INTRODUÇÃO . . . . .	1
MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	9
Método Gerais . . . . .	9
Isolamento e Purificação das Frações Polissacarí- dicas da Placenta . . . . .	11
Hidrólise Ácida Total de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9. .	13
Redução e Acetilação dos Produtos da Hidrólise Áci- da das Frações . . . . .	14
Cromatografia em Coluna das Frações Polissacarídi- cas . . . . .	15
Reação das Frações Polissacarídicas com a Concanava- lina A . . . . .	15
Determinação Enzimática de <u>D</u> -glucose nas Frações..	16
Determinação Enzimática da <u>D</u> -galactose nas Frações.	17
Hidrólise Clorídrica de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 ..	17
Determinação de Grupos Sulfatos nas Frações Polis- sacarídicas . . . . .	18

Ressonância Nuclear Magnética de $^{13}\text{C}$ da Fração polisacarídicas PL-3 . . . . .	18
Metilação das Frações Polissacarídicas PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 . . . . .	18
Metanólise das Frações Polissacarídicas Metiladas. . . . .	19
Tratamento de PL-9 com a $\beta$ -amilase . . . . .	20
Tratamento de PL-9 com Protease . . . . .	21
Determinação do Consumo de Periodato e Ácido Fôrmico Liberado pelo Polímero de Galactose Isolado de PL-9..	22
Análise do tipo Smith dos Grupos Terminais do Polímero de Galactose obtido de PL-9. . . . .	24
Metilação do Polímero de Galactose obtido de PL-9 . . . . .	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	26
Isolamento e Purificação das Frações Polissacarídicas . . . . .	26
Composição de PL-3, PL-6, PL-8, e PL-9 . . . . .	28
Metilação das Frações Polissacarídicas . . . . .	31
Expectroscopia de $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da Fração Polissacarídica PL-3 . . . . .	37
Ação da $\beta$ -amilase sobre a fração PL-9 . . . . .	40
Ação da Protease sobre a fração PL-9 . . . . .	42
Oxidação pelo Periodato do Polímero de Galactose obtido de PL-9 e ácido fôrmico liberado . . . . .	42
Análise tipo Smith dos Grupos Terminais do Polímero de Galactose obtido de PL-9 . . . . .	45
Metilação do Polímero de Galactose obtido da fração PL-9 por ação da Protease . . . . .	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
I	Análise por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida das frações polissacarídicas PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 . . . . .	30
II	Análise por g.l.c. dos produtos derivados das frações polissacarídicas metiladas PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 . . . . .	32
III	Análise por g.l.c. dos alditol-acetatos parcialmente metilados derivados da <u>D</u> -Glucose e <u>D</u> -Galactose das frações polissacarídicas metiladas, considerados separadamente . . . . .	36
IV	Análise por g.l.c. dos produtos da degradação tipo Smith do polímero de <u>D</u> -Galactose obtido de PL-9 . . . . .	46
V	Análise por g.l.c. dos produtos derivados da metilação do polímero de <u>D</u> -Galactose obtido de PL-9 . . . . .	48

## LISTAS DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Placentoma . . . . .	4
2	Cromatograma das frações polissacarídicas PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, em coluna de Sepharose 2B-300 . . . . .	27
3	Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total, seguida por redução e acetilação das frações polissacarídicas PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 . . . . .	29
4	Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de metilação da fração polissacarídica PL-3 . . . . .	33
5	Espectro de <sup>13</sup> C-n.m.r. da fração polissacarídica correspondente a PL-3 . . . . .	38
6	Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total, seguida de redução e acetilação, da fração polissacarídica PL-9, após tratamento com β-amilase . . . . .	41
7	Cromatograma obtido por g.l.c. dos álditois acetatos obtidos da fração polissacarídica PL-9, após tratamento com protease . . . . .	43

8	Gráfico obtido, correspondente ao número de moles de m-periodato de sódio consumidos por molde hexose anidra, a diferentes intervalos de tempo.	44
9	Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de metilação do polímero de <u>D</u> -galactose obtido de PL-9, após tratamento desta fração com uma protease, contendo atividade gluco-sidásica . . . . .	49

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

c.	-	Concentração
$^{\circ}\text{C}$	-	Grau Celsius
Cetavlon	-	Brometo de hexadeciltrimetilamônio.
$^{13}\text{C}$ -n.m.r.	-	Ressonância nuclear magnética de carbono treze.
cm	-	Centímetro
$\text{cm}^3$	-	Centímetro cúbico
$\text{D}_2\text{O}$	-	Óxido de deutério
d.i.	-	Diâmetro interno
g	-	Grama
g.l.c.	-	Cromatografia líquido-gasosa
g.l.c.-m.s.	-	Cromatografia líquido-gasosa e espectrometria de massa.
Hz	-	Hertz
Kg	-	Kilograma
l	-	Litro
M	-	Molaridade
m	-	Metro
m/e	-	Massa/carga
mg	-	Miligrama
min	-	Minuto
ml	-	Mililitro
mm	-	Milímetro

N	- Normalidade
nm	- Nanômetro
PL-3	- Fração polissacarídica, precipitada com tampão borato a 3%, pH 8,5; correspondente a amostras de placenta do 3º mês de gestação.
PL-6	- Fração polissacarídica, precipitada com tampão borato a 3%, pH 8,5; correspondente a amostras de placenta do 6º mês de gestação
PL-8	- Fração polissacarídica, precipitada com tampão borato a 3%, pH 8,5; correspondente a amostras de placenta do 6º mês de gestação
PL-9	- Fração polissacarídica, precipitada com tampão borato a 3%, pH 8,5; correspondente a amostras de placenta do 9º mês de gestação
p/p	- Peso/peso
p.p.m.	- Parte por milhão
R <sub>Gal</sub>	- Tempo de retenção na cromatografia em papel
s	- Segundo
T	- Tempo de retenção em g.l.c.
TCA	- Ácido tricloroacético
TFA	- Ácido trifluoroacético
TMS	- Tetrametilsilano
µg	- Micrograma
µs	- Microsegundo
v/v	- Volume/volume
δc	- Deslocamento químico do sinal em <sup>13</sup> C-n.m.r.

## RESUMO

Polissacarídeos foram extraídos de placenta bovina a diferentes estágios de gestação (3, 6, 8 e 9 meses), com solução aquosa de  $\text{HgCl}_2$  (3%). O material livre de proteína foi então purificado através de precipitação seletiva com Cetavlon na presença de borato de sódio (pH 8,5). As frações assim obtidas, correspondentes a 3, 6, 8 e 9 meses de gestação, foram designadas de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 respectivamente, e cada uma comportou-se de maneira homogênea quando submetida à eletroforese, cromatografia de peneira molecular, e ao tratamento com Concanavalina A.

O conteúdo de polissacarídeo nas frações foi uniforme e a hidrólise ácida forneceu, em cada caso, galactose e glucose como monossacarídeos principais, com pequena proporção de hexosaminas (3-5%). As análises em g.l.c. dos derivados alditol acetatos não mostraram variações apreciáveis na relação  $\underline{\underline{D}}$ -glucose :  $\underline{\underline{D}}$ -galactose entre PL-3 (67,2:32,8) e PL-6 (68,0:32,0); mas houve um decréscimo gradual no conteúdo de  $\underline{\underline{D}}$ -glucose em PL-8 (58,0:42,0) e PL-9 (45,0:55,0).

Estudos de metilação das frações sugeriram que as unidades de  $\underline{\underline{D}}$ -gluco e  $\underline{\underline{D}}$ -galactopiranoose, podem ser consti-

tuintes de uma glucana e galactana, respectivamente, as quais formam um agregado molecular que não foi dissociável nos procedimentos de fracionamento utilizados.

Após tratamento de PL-9 com  $\beta$ -amilase, a proporção de glucose no polissacarídeo diminuiu, indicando a presença de unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosil ligados (1 $\rightarrow$ 4). Da mesma forma, quando PL-9 foi tratado com uma protease bruta, contendo atividade glucosidásica, uma  $\beta$ -D-galactopiranana ramificada residual foi isolada, contendo grupos terminais não redutores (30,0%) e unidades 3-O (39,5%) e 3,6-di-O-substituídos (30,5%). A estrutura da galactana, de acordo com os dados de metilação, não sofreu variação significativa após remoção do componente glucosil.

Assim, é possível que as frações contenham um material semelhante ao glicogênio associado a uma galactana, formando uma agregação molecular, onde a proporção do primeiro diminui com o passar do tempo, ou seja, à medida que a gestação se aproxima do termo.

Esta galactana intimamente associada a glucana não tinha sido ainda relatada em placenta bovina, e sua ocorrência neste órgão, sustenta hipótese de que polissacarídeos contendo galactose estão envolvidos no desenvolvimento fetal.

## ABSTRACT

Polysaccharides were extracted from bovine placenta at different stages of pregnancy, namely terms of 3, 6, 8, and 9 months, with aqueous  $\text{HgCl}_2$ . The protein-free material was then purified by selective precipitation with Cetavlon in the presence of sodium borate at pH 8.5. The fractions obtained from 3, 6, 8, and 9 month-old placentas were designated PL-3, PL-6, PL-8, and PL-9 respectively and were each homogeneous on electrophoresis, molecular-sieve chromatography, and on treatment with Concanavalin A.

Polysaccharide contents of the fractions were uniform and acid hydrolysis provided, in each case, galactose and glucose as principal monosaccharides with small proportions (3-5%) of hexosamines. G.l.c. analysis of derived alditol acetates showed no variation between the  $\underline{\underline{D}}$ -glucose - D-galactose ratio obtained from PL-3 and PL-6, being 68:32, but there was a gradual decrease in the  $\underline{\underline{D}}$ -glucose content PL-8 (58:42) and PL-9 (45:55).

Methylation studies on the fractions suggest that  $\underline{\underline{D}}$ -gluco and  $\underline{\underline{D}}$ -galactopyranosyl units may be constituents of a glucan and galactan respectively which form a molecular aggregate that does not dissociate in the fractionation procedures.

After treatment of PL-9 with  $\beta$ -amylase, the proportion of glucose in the polysaccharide diminished, indicating the presence of (1  $\rightarrow$  4)-linked  $\alpha$ -D-glucopyranosyl residues . Also, when PL-9 was treated with a crude protease having glucosidase activity a residual  $\beta$ -D-galactopyranan was isolated and found to containing nonreducing end-groups (30,0%) and 3-O (39,5%) and 3,6-di-O-substituted (30.5%) units. The structure of the galactan did not vary, according to methylation data, on removal of the glucosyl component.

The fractions thus contain glycogen-like material associated with a galactan as a molecular aggregate and that the proportion of the former in the placenta diminishes with increasing age.

This galactan has not been previously recognized in bovine placenta and its occurrence in this organ supports the hypothesis that galactose-containing polysaccharides are involved in fetal development.

## I. INTRODUÇÃO

Apesar do número considerável de polissacarídeos de origem vegetal, a ocorrência dessas macromoléculas no reino animal restringe-se a umas poucas. Dentre elas, o glicogênio, amplamente distribuído, a quitina, especialmente entre os *Arthropoda*, a celulose entre os *Tunicata* e um polissacarídeo diferente do glicogênio, encontrado em *Molusco*, tendo sido inicialmente denominado de "galactogênio" (48), por se composto de unidades de D-galactose. Apesar das galactanas terem sido bastante estudadas até então, muito pouco se sabe sobre o papel que essas macromoléculas desempenham no ser vivo.

Em vários moluscos do gênero gastrópoda esses polímeros são sintetizados pelo organismo materno e incorporados, no momento da ovogênese, às massas de ovos então formadas (42). Portanto, é de se supor que deva haver uma estreita relação entre essa classe de macromoléculas e os processos reprodutivos, ao menos em moluscos. Recentemente foi demonstrado que galactanas são de fato consumidas pelos embriões dos moluscos em crescimento (39). Este consumo deve ter finalidades energéticas para o embrião uma vez que, em muitas espécies desses animais, o glicogênio só aparece nos ovos, no fim do

desenvolvimento embrionário (49,33). A gluco-galactana de massa de ovos de uma espécie de *Ampullarius*, no momento da oviposição, é constituída de D-galactopiranosose (71%) e D-glucopiranosose (29%) (44). A molécula é altamente ramificada, como em outras  $\beta$ -D-galactopiranas, e a D-glucose localiza-se nas extremidades não redutoras da estrutura como grupo  $\alpha$ -D-glucopiranosídicos ligados (1 + 4) a unidades  $\beta$ -D-galactopiranosídicas. Porém, após o 10º dia de desenvolvimento embrionário a relação galactose: glucose é de 85 : 15, valor que se modifica para 88 : 12 após o 15º dia desde a oviposição. Este fato em combinação com a análise dos resultados da metilação dos polímeros, permite sugerir que a D-glucose é consumida preferencialmente pelo embrião do caramujo provavelmente como fonte de energia.

Analisando estes achados e adotando critérios filogenéticos, Feijó e Vieira Lopes (43) formularam uma hipótese segundo a qual os mamíferos poderiam também, durante a gestação, utilizar modelo molecular energético semelhante ao encontrado nos ovos dos moluscos. No entanto, o ovo nos mamíferos superiores, possui pequena quantidade de nutrientes, sendo seu desenvolvimento fisiologicamente dependente do organismo materno. Para tal, o ovo aloja-se no endométrio do útero e, após uma série de modificações nos tecidos maternos e do próprio ovo, leva à formação de uma estrutura complexa que vai permitir as trocas fisiológicas entre a mãe e o embrião. A implantação do embrião se faz mais ou menos profundamente em relação ao plano uterino. Disso resulta uma maior ou menor agressividade embrionária contra os diversos constituin

tes do endométrio a saber: epitélio do útero, tecido conjuntivo subjacente, vasos maternos. O cório, membrana externa, diferenciada em vilosidades, é o agente desta "agressão". Estas vilosidades estão às vezes dispostas em pequenos amontoados ou placas, isoladas uma das outras, sobre a superfície corial; outras vezes se dispõem em faixas, formando como que cintas na superfície corial; ou se polarizam em um disco único; ou finalmente, se difundem por toda a superfície corial apresentando um desenvolvimento apenas discreto.

Em determinadas espécies - eqüídeos, ruminantes, as relações do cório com o útero são apenas superficiais. Neste caso o tecido fetal é facilmente separado do materno, por ocasião do parto. Em outras espécies - carnívoros, roedores, homem, a intimidade é bem maior. O desentrosamento das vilosidades não é possível, pois elas se constituem com tecidos maternos em órgão único. Enquanto no primeiro caso se fala em semiplacenta, no segundo se fala em placenta ou placenta verdadeira. Do ponto de vista histológico a placenta bovina é classificada como sendo do tipo sindesmo-corial. Neste caso, o cório agride o epitélio do útero, mantendo relações geralmente com o tecido conjuntivo subepitelial. Esta relação não se verifica em toda a superfície do útero e sim em determinadas partes, isentas de glândulas - as saliências denominadas carúnculas uterinas, caracterizando a placenta cotiledonada. Os cotilêdones fetais se unem à carúncula durante a gestação formando os chamados placentomas. (47), como mostrado na figura 1.

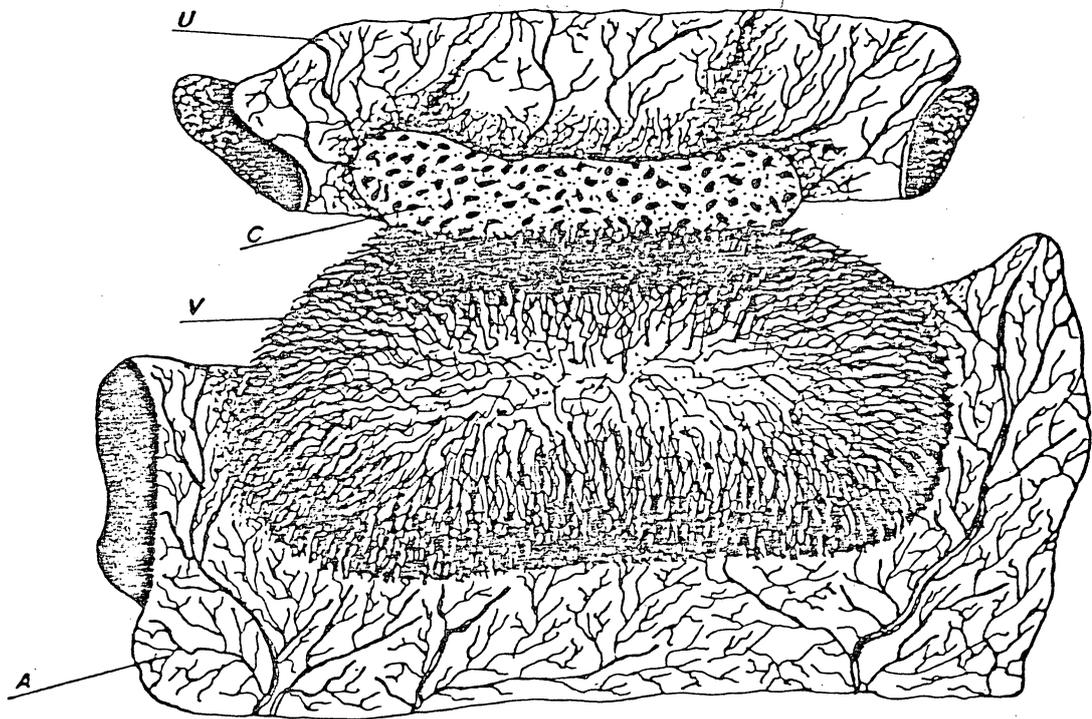


FIGURA 1: Placentoma (Cotilédone fetal e carúncula)

V. Cotilédone fetal com suas vilosidades, parcialmente destacado das criptas da carúncula

C. carúncula

A. Membrana Corio-alantóide.

U. Útero.

A evolução da placenta nos mamíferos não envolveu o desenvolvimento de novas estruturas fetais, mas, ao contrário, modificações de estruturas já presentes nos ancestrais répteis (57). E esta foi a assertiva que levou Feijó e V. Lopes (43) a utilizarem a placenta como objetivo de seu estudo e investigação.

A placenta, em inúmeras espécies, tem sido intensamente investigada com respeito a produção e utilização de energia. Foi Driessen (15) em 1907, quem demonstrou, utilizando técnicas histológicas, a presença de glicogênio na placenta humana. Porém foi Claude Bernard em 1859, quem primeiro evidenciou este polissacarídeo em placenta (de coelho). Ele sugeriu que o glicogênio presente na placenta deveria servir como fonte auxiliar de carboidratos para o feto até que este adquirisse a capacidade de armazená-lo, e denominou a placenta de fígado substituto do embrião em desenvolvimento (7). De fato, o conteúdo de glicogênio e a atividade da glucose-6-fosfatase na placenta humana são altos no início da gestação e decrescentes com o tempo, enquanto que a quantidade de glicogênio e a atividade de glucose-6-fosfatase do fígado fetal são insignificantes no início da gestação, assumindo valores mais altos à medida que declinam as funções placentárias (57). Este decréscimo na taxa de glicogênio placentário também está relacionado com o concomitante aumento da habilidade do fígado fetal em armazenar glicogênio (12) e de sintetizar as enzimas necessárias para o seu metabolismo (40).

Os padrões no metabolismo de carboidratos na placenta humana diferem, em alguns aspectos, daqueles encontrados nas placentas de outros animais. Assim, o conteúdo de glicogênio na placenta humana, como já foi dito, é alto no início da gestação, declinando à medida que a gestação evolui. Contrariamente, placentas de ratos e de coelhos têm um baixo conteúdo de polímero no início da gestação, que aumenta atingindo o valor máximo em torno de 2/3 do período da gestação, diminuindo então até o nascimento (38). Esta variação de comportamento pode estar relacionada ao fato, já observado, de que a taxa de glicogênio no fígado fetal humano começa a aumentar muito mais cedo, proporcionalmente, do que a taxa de glicogênio do fígado fetal de ratos e coelhos (58, 59).

Uma outra atividade placentária é a conversão de glucose a frutose (27) que é lançada no plasma fetal. A produção de frutose pela placenta foi demonstrada "in vivo" por Huggett (36) mas o possível papel da frutose no metabolismo fetal permanece obscuro. Sabe-se, no entanto, que animais com altas taxas de glicogênio na placenta têm pouca frutose no sangue fetal, ao passo que animais com altas quantidades de frutose no sangue do feto possuem pouco glicogênio na placenta (37). Em ovelhas e outros ungulados, o conteúdo de frutose é mais alto no sangue fetal do que no materno, podendo atingir até 1 mg/ml. (5).

Um fato bastante importante, há muito observado, é a relativa estabilidade do conteúdo de glicogênio na placenta. Sua taxa resiste a alterações metabólicas no organismo

materno (35) assim como a amplas flutuações nos níveis da glicemia materna e/ou fetal (57). Mas a quantidade de glicogênio na placenta de coelho apresentou um aumento após administração de cortisona (32). Em cobaia, a degradação de glicogênio placentário é estimulada por epinefrina e mediada por cAMP celular (60), havendo estímulo da atividade da glicogênio fosforilase e significativa redução na atividade da glicogênio sintetase.

Na placenta, a captação de glucose da circulação materna dá-se pelos "brush-border" que são os primeiros sítios embrionários da síntese do glicogênio (8). Portanto, as células sinciciotrofoblásticas devem conter as enzimas para o metabolismo embrionário do glicogênio. De fato, Fisher e Laine (19) encontraram altas concentrações de glucose do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  associados com as microvilosidades isoladas de sinciciotrofblastos de placenta humana aos 3 meses de gestação. Estes autores detectaram séries de tetra e trissacarídeos, e propuseram uma relação entre estes malto-oligossacarídeos e a atividade de  $\alpha$ -amilase associada a estas células, relacionando-os ao metabolismo do glicogênio.

Apesar das inúmeras referências, na literatura, sobre a ocorrência de glicogênio em placenta, e do grande número de publicações com enfoque energético para o embrião + feto, nenhuma citação foi encontrada com referência à presença de polímeros de galactose neste tecido. Se acaso presentes na placenta, estas macromoléculas poderiam também desempenhar, a exemplo do que ocorre em molusco, papel energético para o feto. Feijó e Vieira Lopes (43) quando investigaram a placen-

ta bovina no 4º mês de gestação, obtiveram uma fração polisacarídica neutra contendo glucose como principal componente (~80%) e uma menor porção de galactose (~20%). Os autores sugeriram que a ocorrência desses polissacarídeos na placenta bovina poderia confirmar a hipótese segundo a qual tais macromoléculas, por sua localização e arquitetura molecular, seriam a garantia para a manutenção do metabolismo energético do feto em desenvolvimento. Sugeriram ainda que a relação glucose : galactose se altera na placenta durante a gestação, em função da idade, o que indica a ocorrência de estruturas poliméricas dinâmicas.

No presente trabalho, pretendemos investigar as possíveis variações estruturais que devem ocorrer nos polissacarídeos neutros de placenta bovina em função da idade de gestação.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

Métodos Gerais: A análise das frações polissacarídicas por eletroforese foi realizada em papel acetilado (Cello gel) segundo o método de Dudman e Bishop (17), com equipamento Fanem, apresentando cada uma das frações apenas uma banda.

A cromatografia em fase gasosa (g.l.c.) foi realizada em Cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detetor de ionização de chama, e utilizando-se nitrogênio como gás de arraste (37,5 ml/min). As temperaturas da câmara de injeção e do detetor foram de 200<sup>o</sup> e 250<sup>o</sup>C, respectivamente. As análises dos alditol acetatos e dos derivados alditol acetatos parcialmente metilados foram feitas em coluna de aço inoxidável (200 x 0,15 cm, d.i.), empacotada com ECNSS-M a 3% (p/p) sobre "gás chrom Q" de 100-120 mesh (25) a 160<sup>o</sup>C, a 180<sup>o</sup>C e com temperatura programada (120<sup>o</sup>C-160<sup>o</sup>C, 2<sup>o</sup>C/min.). Os tempos de retenção (T) dos alditol acetatos parcialmente metilados foram referidos ao do 1,5-di-o-acetil-2,3,4,6-tetra-o-metil-D-glucitol; e os dos alditol acetados referidos ao do arabinitol pentacetato. Em todas as análises por g.l.c., as áreas foram calculadas por triangulação (52).

A espectrometria de massa foi realizada com os derivados alditol acetatos em espectrômetro Finnigan (g.l.c.-m.s) modelo 4000, acoplado a um sistema de dados Inco 2300 e equipado com coluna capilar (30mx0,25mm,d.i.) preenchida com OV-225. Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons, repetitivamente a cada 2 segundos, desde massa 40 até massa 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50°C com a finalidade de se obter uma faixa estreita dos solutos (26) e então rapidamente programada (40°C/min.) a 182°C ("hold"). O gás de arraste foi hélio com a velocidade linear de 22 cm/s.

A cromatografia em papel foi realizada pelos métodos descendente e ascendente, com papel Whatmann nº 1, nos seguintes sistemas de solvente (v/v): a) 1:5:3:3 (fase superior) benzeno-1-butanol-piridina-água; b) 200:17:1 butanona-água-amônia. A visualização dos açúcares foi efetuada com os reagentes de nitrato de prata alcalino (56), cloridrato de para-anisidina (34) (para açúcares redutores) e ninhidrina (para hexosaminas). A mobilidade dos açúcares livres na cromatografia em papel foi relacionada à da D-galactose ( $R_{Gal}$ ).

A determinação quantitativa de proteínas foi feita com o reagente Folin-Ciocalteu, segundo processo descrito por Lowry et alii (45, 21). A absorbância foi lida a 660 nm, comparativamente ao padrão de soro-albumina cristalina, na faixa de 10 a 100 µg/ensaio.

Para as dosagens de açúcar total foi utilizado o mē-

todo do fenol-ácido sulfúrico (18), com as leituras a 490 nm, usando-se como padrão a D-galactose na faixa de 10 a 100  $\mu$ g/en<sub>saio</sub>. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (54) e Nelson (50).

As determinações espectrofotométrica para a região do visível foram realizadas em aparelho Coleman Junior, modelo 6A.

As soluções quando liofilizadas o foram em equipamento Virtis, modelo 10-145 MR-BA. As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório Büchi, a pressão reduzida e a temperatura nunca superior a 50°C.

As rotações ópticas específicas foram determinadas em polarímetro Schmidt Heesch a 25°C.

Isolamento e Purificação das Frações Polissacarídicas da Placenta: As placentas foram obtidas no Abatedouro Argus (São José dos Pinhais, PR) de várias vacas, em quatro estágios diferentes de gestação: 3º, 6º, 8º e 9º meses. Para cada estágio foram coletadas amostras de, pelo menos, quatro animais diferentes. Os tempos de gestação foram determinados usando-se como critérios as características morfológicas externas dos fetos e o método de Hetzel (47).

Imediatamente após o abate, as placentas foram removidas, acondicionadas em sacos plásticos, mantidas a temperatura de 0-4°C e transportadas ao laboratório. Durante a operação de limpeza dos nódulos placentários, também chamados de

placentomas (compostos da carúncula e do cotilédone fetal), quando então foram removidos os restos de tecido uterino e da membrana cório-alantóide, os mesmos foram mantidos em acetona. Antes de serem submetidos a homogeneização, os nódulos foram retirados da acetona, pesados (3,8 kg; 4,0 kg; 4,5 kg; e 2,3 Kg, correspondendo ao 3º, 6º, 8º e 9º meses de gestação, respectivamente); em seguida homogeneizados (liquidificador alta rotação, 5 min.) com  $\text{HgCl}_2$  (2,5 ml  $\text{HgCl}_2$  a 3%/g de tecido) e os sistemas deixados em repouso por 12 horas em câmara fria. Após este tempo, os homogenatos foram centrifugados (5000 rpm, 10 min.) e os sobrenadantes coletados tiveram seus volumes reduzidos por evaporação a baixa pressão, após o que foram tratados com etanol (3 volumes) e deixados em repouso por 12 horas (0-4°C). Após centrifugação (5000 rpm/15 min.) os precipitados foram dissolvidos em água e submetidos a diálise por 48 horas contra água corrente. Em seguida, as soluções foram tratadas com etanol (3 volumes), submetidas a centrifugação, e os precipitados assim obtidos foram lavados com acetona (3 vezes). Os pós cetônicos (5,7 g; 6,0 g; 7,0 g e 3,4 g das preparações do 3º, 6º, 8º e 9º meses de gestação, respectivamente), representando cerca de 1% do peso seco, foram dissolvidos em água (1 g/100 ml), e submetidos ao fracionamento com base quaternária de amônia (brometo de hexadeciltrimetil amônia, Cetavlon) em diferentes pH como descrito por Duarte e Jones (16). Os precipitados obtidos em pH 7,0 das várias frações, foram isolados por centrifugação (5000 rpm/10 min.), e guardados para uma posterior investigação. Os sobrenadantes aquosos, contendo Cetavlon a pH 7,0 foram tra-

tados com tampão borato a 3%, pH 8,5. O material assim precipitado de cada uma das frações, foi isolado por centrifugação (5000 rpm/10 min.), solubilizado em ácido acético 2N e precipitado com 3 volumes de etanol (3 vezes). Estes precipitados, correspondentes às amostras de placenta do 3º, 6º, 8º e 9º meses de gestação, foram dissolvidos em água destilada e submetidos a diálise contra água destilada por 72 horas. As frações foram finalmente precipitadas com etanol (3 volumes), lavadas com acetona (3 vezes) e secas em estufa a 40°C. Tais frações, assim obtidas, foram denominadas PL-3 [449 mg; 7,8% do p̄o cetônico;  $[\alpha]_D^{25} + 144^\circ$  (c, 0,35 em água)], PL-6 [454mg; 7,6% do p̄o cetônico;  $[\alpha]_D^{25} + 140^\circ$  (c, 0,50 em água)], PL-8 [520 mg; 7,4% do p̄o cetônico;  $[\alpha]_D^{25} + 123^\circ$  (c, 0,50 em água)] e PL-9 [250 mg; 7,3% do p̄o cetônico;  $[\alpha]_D^{25} + 105^\circ$  (c, 0,50 em água)], correspondendo às preparações de placentas do 3º, 6º, 8º e 9º meses de gestação, respectivamente.

Hidrólise Ácida Total de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9. Amostras (10 mg) de cada uma das frações polissacarídicas foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 1 N (3 ml), durante 15 horas, à temperatura de 100°C em ampôlas seladas. Após neutralização com carbonato de bário (pH 4,5), os sistemas foram submetidos a centrifugação e os sobrenadantes concentrados por evaporação. Após esta operação, os produtos da hidrólise ácida das frações foram analisados por cromatografia em papel.

Amostras (10 mg) de cada uma das frações polissacarí

dicas foram também submetidas à hidrólise com ácido trifluoracético (TFA) 2N (2 ml) a 100°C por 15 horas (1). Após evaporação à secura, os resíduos foram dissolvidos em água e as soluções resultantes submetidas à cromatografia em papel para a análise dos produtos de hidrólise. Assim foi possível verificar que PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 são compostos de glucose e galactose.

Redução e Acetilação dos Produtos da Hidrólise Ácida das Frações: Amostras dos hidrolisados ácidos das frações polissacarídicas foram reduzidas com boróidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) (53) à temperatura ambiente por 16 horas ( $\text{pH} < 9,0$ ). As reações foram interrompidas com ácido acético 2 N e as soluções contendo os alditois dos correspondentes monossacarídios reduzidos foram tratadas com resina Dowex 50w x 8, 200-400 mesh, forma  $\text{H}^+$ , para a remoção dos íons sódio. O ácido bórico resultante foi eliminado na forma do éster volátil borato de metila, por codestilação com metanol. Os alditois assim obtidos foram, então, submetidos a acetilação (61), com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1, v/v) por 5 horas a 100°C. Esta mistura foi tratada com água (2-4°C) e os açúcares acetilados extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi eliminada das preparações por tratamentos sucessivos com ácido sulfúrico 1 N e por evaporações sucessivas com tolueno. Os alditol acetatos assim obtidos foram analisados por g.l.c. e por g.l.c.-m.s., (m/e) 73, 145, 217, 289 e 361) como já descrito em Métodos Gerais. As relações glucitol : galactitol (moles%) fo

ram de 67,2 : 32,38; 68,0 : 32,0; 58,0 : 42,0 e 45,0 : 55,0 para PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, respectivamente.

Cromatografia em Coluna das Frações Polissacarídicas: Amostras (3 mg) de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 foram submetidas à cromatografia em colunas de Sepharose 6B,4B-200 e 2B-300 (30 x 1,8 cm,d.i.) e eluidas com água destilada com um fluxo de 4 ml/hora. Frações de 1 ml de eluato foram coletadas, com o auxílio de um coletor automático, à temperatura ambiente. Aliquotas de 0,2 ml de cada fração foram retiradas para a determinação de açúcar total e(ou) proteína. As amostras de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 comportaram-se de maneira homogênea quando submetidas a esta técnica apresentando apenas um pico. Com uma recuperação média em torno de 97%, os polissacarídios foram, em todos os casos, eluidos no volume morto - ( $V_0$ ) das colunas. Para a eluição do "Dextran-blue", utilizado para determinar  $V_0$ , usou-se uma solução aquosa de cloreto de sódio 0,9 g%.

Reação das Frações Polissacarídicas com a Concanavalina A (20)

O teste de complexação de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 com a Concanavalina A foi executado do seguinte modo: com tampão acetato 0,1 M pH 6,0 (contendo  $MnCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  na concentração 0,001 M e NaCl 1M) foram preparados 20 ml de solução contendo 15 mg da fração polissacarídica correspondente, e 10 ml de uma solução contendo 5 mg de Concanavalina A (tipo IV, Sigma). Em seguida as soluções foram misturadas e o sis-

tema resultante permaneceu em agitação (agitador magnético) por 30 minutos. Após centrifugação, foi investigada no sobrenadante a presença de açúcar pelo método do fenol - ácido sulfúrico. Por ter sido este teste negativo, o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi então tratado com uma solução de metil- $\alpha$ -D-manosídeo (4 ml, 25 mg/ml) e, depois de 1 hora de agitação, adicionou-se uma solução de TCA a 10% a frio (12 horas). Após centrifugação, o sobrenadante foi deixado em diálise por 24 horas contra água corrente e, em seguida, tratado com 3 volumes de etanol. O precipitado resultante, isolado por centrifugação, foi dissolvido em água e liofilizado. Amostra deste material liofilizado (de cada uma das frações estudadas), após hidrólise ácida, quando submetida a cromatografia em papel e g.l.c. demonstrou total identidade com a fração polissacarídica original (não tratada com Concanavalina A) ou seja, constituída pelas mesmas proporções de glucose e galactose.

Determinação Enzimática da D-glucose nas Frações: Uma amostra (5 mg) do hidrolisado ácido (TFA) de cada uma das frações polissacarídicas, foi incubada a 37°C por 1 hora, com o reativo da glucose oxidase, peroxidase e o-dianisidina, de acordo com a técnica descrita por Dahlqvist (12). A absorbância foi determinada a 420 nm. PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 tiveram, respectivamente 65,0%; 65,0%; 57,5%; e 43,0% de seu açúcar total (previamente dosado no hidrolisado pelo método fenol ácido sulfúrico) oxidado pela enzima.

Determinação Enzimática da D-galactose nas Frações: Uma amostra do hidrolisado ácido (TFA) de cada uma das frações polissacarídicas (0,4 ml contendo de 20 a 30 µg de açúcar redutor) foi incubada com 200 µg de D-galactose oxidase e 1,6 ml de o-dianisidina-peroxidase (reagente cromogênico), de acordo com técnica descrita por Amaral et alii. (2). O sistema de incubação foi mantido a 37°C por 60 minutos. A absorbância foi determinada a 420 nm, utilizando-se padrões que variam de 18 a 54 µg de D-galactose. As frações polissacarídicas PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 tiveram, respectivamente 30,0%; 31,0%; 41,5% e 51,0% de seu açúcar total (previamente dosado no hidrolisado, pelo método do fenol-ácido sulfúrico) transformado em galactose hexodialdose pela enzima.

Hidrólise Clorídrica de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9: Para investigar a presença de hexosaminas, uma amostra (5 mg) de cada fração polissacarídica foi submetida à hidrólise com ácido clorídrico 6N (2 ml) durante 6 horas a 100°C. Ao esfriar, o volume foi completado para 10 ml com água destilada, e o sistema passado através de coluna de Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H<sup>+</sup> (coluna de 10x1cm, d.i.). Após eluição das substâncias interferentes com 10 ml de HCl 0,25 N e 10 ml de água deionizada, as hexosaminas foram eluídas da coluna com ácido clorídrico 2N e analisadas com o reagente de Elson-Morgan, segundo o processo descrito por Boas (9).

As frações polissacarídicas PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 apresentaram cerca de 3% de hexosaminas, caracterizadas como

sendo galactosamina e glucosamina, por cromatografia em papel, pelo método descendente (72 hs.), no seguinte sistema de solvente: (v/v) benzeno - n-butanol - piridina - água (1:5:3:3) fase superior; e a visualização foi feita com cloridrato de p-anisidina, e ninhidrina.

#### Determinação de grupos Sulfato nas Frações Polissacarídicas:

Os grupos sulfato foram determinados nos hidrolisados (ácido fórmico a 25% por 24 horas a 100°C) das frações polissacarídicas, na forma de complexo de benzidina-sulfato, segundo o processo descrito por Antonopoulos (4). As frações PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 apresentaram apenas traços de grupamentos sulfato.

Ressonância Nuclear Magnética de  $^{13}\text{C}$  da Fração Polissacarídica: O espectro de  $^{13}\text{C}$ .n.m.r. da fração polissacarídica PL-3 (100 mg) foi obtido em espectrômetro Bruker AM-360 WB incorporado ao transformador de Fourier, usando-se  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente a 33°C. Os parâmetros espectrais empregados foram: "spectral width" de 20000 Hz, "acquisition time" de 0,410 s, "pulse width" de 21,0  $\mu\text{s}$  e "number of transients" de 11792. Os deslocamentos químicos foram expressos em (p.p.m.), relativos à ressonância de  $\text{Me}_4\text{Si}$  (TMS) determinada em experimento separado. ( $\text{D}_2\text{O}$  "lock") (23).

Metilação das Frações Polissacarídicas: PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 foram inicialmente submetidas ao processo de metilação de Haworth (31) por quatro vezes do seguinte modo: uma amostra de cada uma das frações (45 mg) foi dissolvida em água

(1 ml) e tratada com 5 ml de NaOH a 40% e 2,5 ml de dimetilsulfato. Esses reagentes foram sendo acrescentados à solução gota a gota, durante 4 horas sob agitação (agitador magnético) e à temperatura ambiente. Durante este processo de metilação, acrescentou-se acetona (2 ml) para solubilizar os polissacarídeos parcialmente metilados. Em seguida, a solução foi neutralizada com ácido sulfúrico 6 N (pH 7,0), dialisada contra água corrente durante 48 horas e, finalmente, concentrada por evaporação. Este processo de metilação foi repetido por mais três vezes para cada fração polissacarídica. Assim, os polissacarídeos parcialmente metilados, de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, foram submetidos ao processo de metilação de Hakomori (28) do seguinte modo: o material parcialmente metilado de cada fração (40 mg) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (2 ml) e tratado com 1,75 mEq de solução do íon metilsulfínil por 6 horas à temperatura ambiente e com agitação constante. Adicionou-se então 0,5 ml de iodeto de metila a cada um dos sistemas, tendo-se o cuidado para que a temperatura não ultrapassasse 25°C. Após 15 minutos, as reações foram interrompidas e os sistemas submetidos à diálise por 48 horas contra água corrente. Finalmente, os polissacarídeos metilados foram extraídos com clorofórmio e, após evaporação, verificou-se uma recuperação de cerca de 50%.

Metanólise das Frações Polissacarídicas Metiladas: Uma amostra (10 mg) de cada fração polissacarídica já metilada, foi tratada com uma mistura de metanol-HCl a 5% (3ml) por 5 horas a 100°C, em ampôlas seladas, segundo o processo descrito

por Bouveng e Lindberg (10). As soluções resfriadas foram neutralizadas com carbonato de prata e as misturas dos metil glicosídeos obtidos dos polissacarídeos metilados derivados de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, foram deixadas na forma redutora por tratamento com HCl 0,5 M (1 ml) por 5 horas a 100°C. Uma vez resfriadas, as soluções foram neutralizadas com carbonato de prata, filtradas e evaporadas até a secura. Os açúcares metilados, na forma redutora, foram reduzidos com NaBH<sub>4</sub> e em seguida acetilados, como já descrito. Os alditol acetatos parcialmente metilados, resultantes deste tratamento, foram então analisados por g.l.c. conforme já citado.

Tratamento de PL-9 com a β-amilase: A fração polissacarídica PL-9 foi submetida à ação de depolimerização enzimática com β-amilase (1,4-α-D-glucana maltohidrolase, de *Aspergillus niger*, da Sigma) (46) do seguinte modo: Uma solução contendo 0,4 g/% de polissacarídeo 0,5 mM-glutation, 0,05% soro albumina e 30 mM-de tampão de acetato de sódio - ácido acético - (pH 4,8) e 0,75 ml de solução enzimática (1 mg/ml). O sistema foi incubado à temperatura ambiente (20-22°C), em atmosfera de tolueno. Após 12 horas, outra quantidade de enzima foi adicionada. A incubação foi interrompida quando a quantidade de açúcar redutor liberada, avaliada através de dosagens periódicas, permaneceu constante. Em seguida o sistema foi submetido a centrifugação e o sobrenadante deixado em diálise por 24 horas contra água corrente. Após essa operação, a solução foi tratada com etanol (3 volumes), centrifugada, e o precipitado dissol

vido em água e liofilizado. Uma amostra deste material foi submetida à hidrólise ácida, o hidrolisado reduzido com ...  $\text{NaBH}_4$  e, em seguida, acetilado como já descrito anteriormente. Assim, os alditol acetatos obtidos foram analisados por g.l.c., tendo sido observada a presença de galactitol (80 moles%) e glucitol (20 moles%).

Tratamento de PL-9 com Protease: Uma amostra de PL-9 (100mg) foi submetida à ação enzimática proteolítica (Protease, tipo II, de *A. orizae*, da Sigma, 2x10mg) em solução de acetato de amônia (pH: 8,5), num volume total de 80 ml. A solução contendo também cloreto de cálcio na concentração final de 0,005 M, foi deixada em estufa 168 horas a 37°C com tolueno como preservativo. Após esse tempo, a solução foi centrifugada, e o sobrenadante tratado com etanol (3 volumes) e novamente submetido à centrifugação. O sobrenadante, assim obtido, foi evaporado à secura e o resíduo resultante solubilizado em água para a pesquisa de açúcar redutor. Esta pesquisa foi positiva, e a cromatografia em papel evidenciou apenas a presença de glucose. O precipitado obtido pela ação do etanol foi dissolvido em água e deixado em diálise por 24 horas contra água corrente, após o que foi submetido à desproteínição pelo método de Sevag (55) (3 vezes). A fração aquosa resultante do processo de Sevag, uma vez centrifugada, foi tratada com etanol (3 volumes). O precipitado isolado por centrifugação foi dissolvido em água e liofilizado (cerca de 55 mg). Uma amostra do polímero obtido (5 mg) foi submetido a hidrólise ácida total. A análise por cromatografia em pa-

pel revelou apenas galactose entre os produtos da hidrólise. Após redução com  $\text{NaBH}_4$  e acetilação, a análise por g.l.c. evidenciou somente galactitol como o único alditol acetato resultante. O polímero obtido por este processo, apresentou ainda traços de hexosaminas (9).

Determinação do Consumo de Periodato e Ácido Fórmico Liberado pelo Polímero de Galactose Isolado de PL-9: Uma amostra (30 mg) do polímero de galactose obtido da fração polissacarídica PL-9 por ação da protease, foi oxidada com m-periodato de sódio 0,01 N (100 ml) durante 94 horas à temperatura de 0-2°C e na ausência de luz. A diferentes intervalos de tempo foram tomadas alíquotas de 5 ml da solução para a determinação do consumo de periodato (51). Esta medida é feita por titulação com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,01 N usando-se solução de amido a 1 g% como indicador.

O cálculo do número de moles de periodato consumidos por cada mol de hexose anidra foi feito através da seguinte equação:

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

$$\frac{\text{Moles de periodato}}{\text{Mol de hexose anidra}} = \frac{\text{Volume total da solução oxidante} \cdot X \cdot 162}{\text{g do polissacarídeo} \cdot 1000}$$

onde:

X = Molaridade da solução oxidante

B = ml de tiosulfato gastos na titulação do branco

A = ml de tiosulfato gastos na titulação da amostra

No gráfico obtido, correspondente ao número de moles de m-periodato de sódio consumidos por mol de hexose anidra, a diferentes intervalos de tempo, foi determinado o valor real da quantidade de periodato requerida para a oxidação completa do polissacarídeo extrapolando-se a curva para o tempo zero (Fig. 8).

O ácido fórmico liberado por mol de hexose anidra, após 94 horas de oxidação, foi determinado pelo método de Barker e Somers (6) e por titulação potenciométrica em atmosfera de nitrogênio (3). O cálculo foi feito através da seguinte equação:

$$Y = \frac{\text{ml de NaOH} \cdot N \text{ de NaOH} \cdot \text{Volume da Solução Oxidante} \cdot 162}{\text{ml de alíquota} \cdot g \text{ do polissacarídeo} \cdot 1000}$$

onde:

Y = número de moles de ácido fórmico liberados por mol de hexose anidra

Para o polímero de galactose obtido de PL-9, as quantidades de periodato consumido e de ácido fórmico liberado (em moles/mol de hexose anidra) foram de 0,60 e 0,30 respectivamente.

Análise tipo Smith dos Grupos Terminais do Polímero de Galactose obtido de PL-9. (30). Uma amostra (20 mg) do polímero de galactose (galactana) foi oxidado com m-periodato de sódio durante 94 horas como descrito no tópico anterior. O excesso de agente oxidante foi então destruído pela adição de etileno glicol (1 ml) e a solução foi submetida à diálise contra água corrente por 24 horas. Após esta operação, a solução contendo o polissacarídeo oxidado foi tratada com boroi-dreto de sódio durante 2 horas à temperatura ambiente. O excesso do agente redutor foi destruído pela adição cuidadosa de ácido acético 2 N até pH 7,0 e a solução foi novamente submetida a diálise por 24 horas contra água corrente. A fração não dialisável foi evaporada à secura e submetida à hidrólise com ácido trifluoracético 2 N por 15 horas a 100°C. Após a hidrólise, o excesso de TFA foi removido por evaporação, e os alditóis submetidos a acetilação com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1) (2 ml) por 5 horas a 100°C, como já descrito. Os alditol acetatos resultantes foram então analisados por g.l.c. e identificados como glicerol-tri-(33,8 moles%) e galactitol-hexacetato (66,2 moles%).

Metilação do Polímero de Galactose obtido de PL-9: Uma amostra (20 mg) do polímero obtido pelo tratamento da fração polissacarídica PL-9 com protease, foi metilada quatro vezes pelo processo de Haworth e uma vez pelo método de Hakomori, procedimento estes já descritos anteriormente.

Metanólise do Polímero de Galactose Metilado: Uma amostra - (15 mg) do polissacarídeo metilado foi tratada com uma mistura de metanol-HCl a 5% (1,5 ml) por 5 horas a 100<sup>0</sup>C. Os metil glicosídeos obtidos foram deixados na forma redutora por tratamento com HCl 0,5 M (1 ml) por 5 horas a 100<sup>0</sup>C e, em seguida reduzidos com boroidreto de sódio e acetilados. Os alditol acetatos parcialmente metilados resultantes foram então analisados por g.l.c., como já descrito.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e Purificação das Frações Polissacarídicas: Preparações polissacarídicas isoladas dos nódulos placentários bovinos (constituídos pelo cotilédone fetal e a carúncula) a diferentes tempos de gestação (3, 6, 8 e 9 meses), após desproteinização com  $\text{HgCl}_2$ , foram purificadas por complexação com base quaternária de amônia (Cetavlon) na presença de tampão borato (pH 8,5). As frações, assim obtidas (PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, de placentas no 3º, 6º, 8º e 9º meses de gestação, respectivamente), apresentaram apenas uma banda quando submetidas a eletroforese. Apesar da análise dos dados de metilação (ver adiante) ter sugerido a presença de pelo menos dois componentes polissacarídicos em PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, não foi possível dissociá-los pelo uso de peneiras moleculares (Fig. 2) nem pela complexação com a Concanavalina A. Assim, as frações foram julgadas apropriadas para os estudos a que se propõe o presente trabalho. Quando analisados pelo método de Lowry, todas as frações apresentaram uma quantidade de proteína, de cerca de 3% (p/p), que foi sempre eluída das colunas cromatográficas no mesmo volume de eluição dos polissacarídeos componentes.

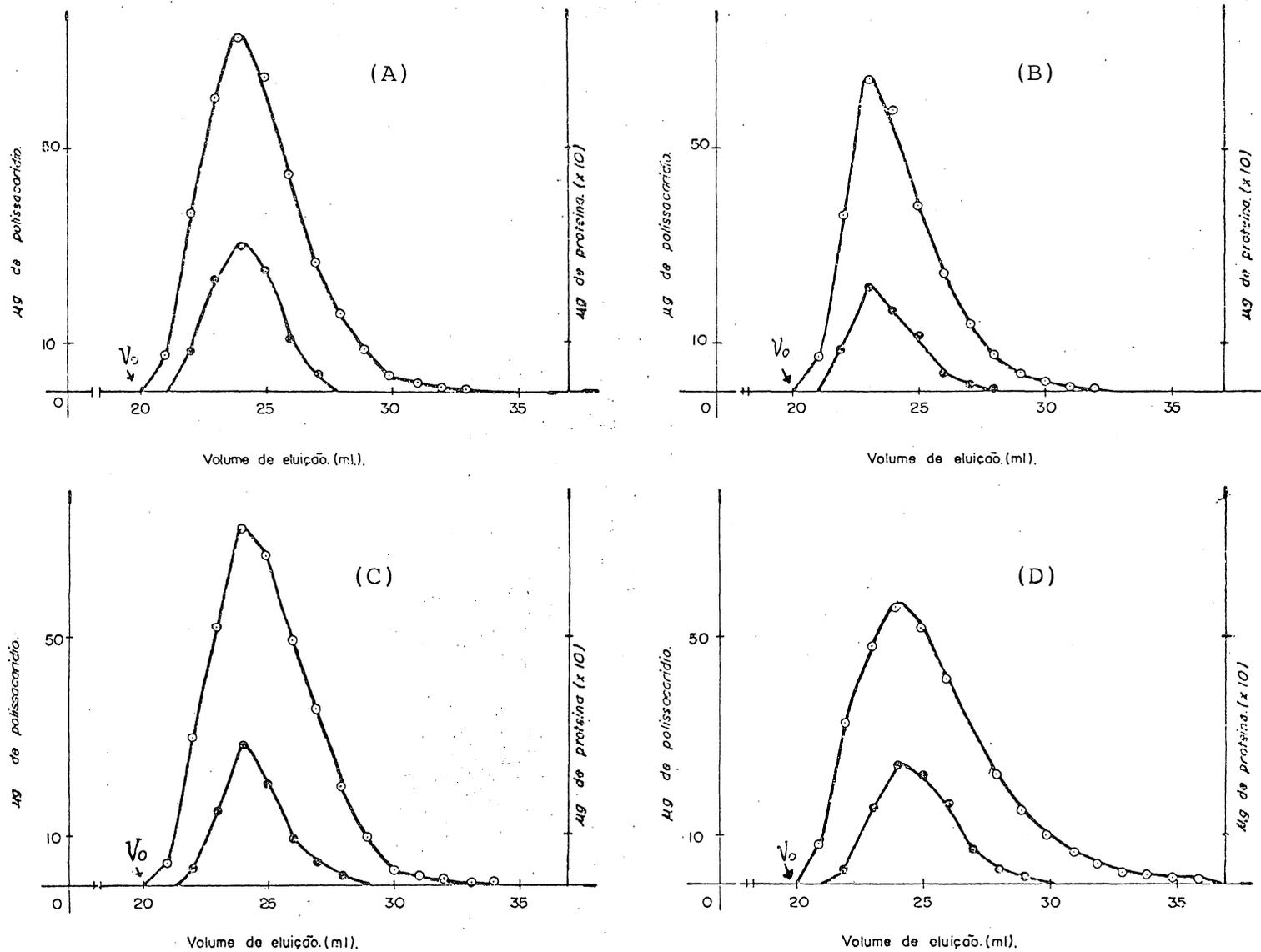


FIGURA 2: Cromatograma das frações polissacarídicas em colunas de Sepharose 2B-300. Eluição com água destilada. Frações de 1 ml.

(A) - PL-3; (B) - PL-6; (C) - PL-8; (D) - PL-9

- polissacarídeo
- proteína

Composição de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9: O conteúdo de polissacarídeo(s) em PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9 (7,8% do p $\bar{o}$  cetônico em PL-3) não varia de modo significativo durante a gestação em bovino (7,6%; 7,4% e 7,3% do p $\bar{o}$  cetônico para PL-6, PL-8 e PL-9, respectivamente). A hidrólise ácida das frações apresentou como produtos principais glucose e galactose (Fig. 3, Tabela I) além de pequena proporção de hexosaminas (cerca de 3% em PL-3 e PL-6 e 5% em PL-8 e PL-9) caracterizadas como glucosamina e galactosamina por cromatografia em papel. Em todas as frações encontrou-se apenas traços de grupamentos sulfato.

As determinações enzimáticas usando-se D-glucose oxidase e D-galactose oxidase, permitiram excluir, nas estruturas dos polissacarídeos das frações estudadas, a presença de L-enantiômeros.

Como pode ser visto na Tabela I, não existe variação na relação D-glucose: D-galactose entre PL-3 e PL-6. No entanto existe um decréscimo significativo na porcentagem de D-glucose, indo de 68,0 moles% em PL-6 para 45,0 moles% em PL-9 passando pelo valor intermediário de 58 moles% em PL-8. Paralelamente há um aumento gradativo na porcentagem de D-galactose, de 32,0 moles% em PL-6 para 55,0 moles% em PL-9. Considerando, como já foi anteriormente demonstrado, que não há variação significativa na quantidade absoluta dos polissacarídeos nestas frações durante a gestação, a diminuição na quantidade de unidades de D-glucose observada pode ser indicativa do consumo desse monossacarídeo pelo feto e(ou) pelos

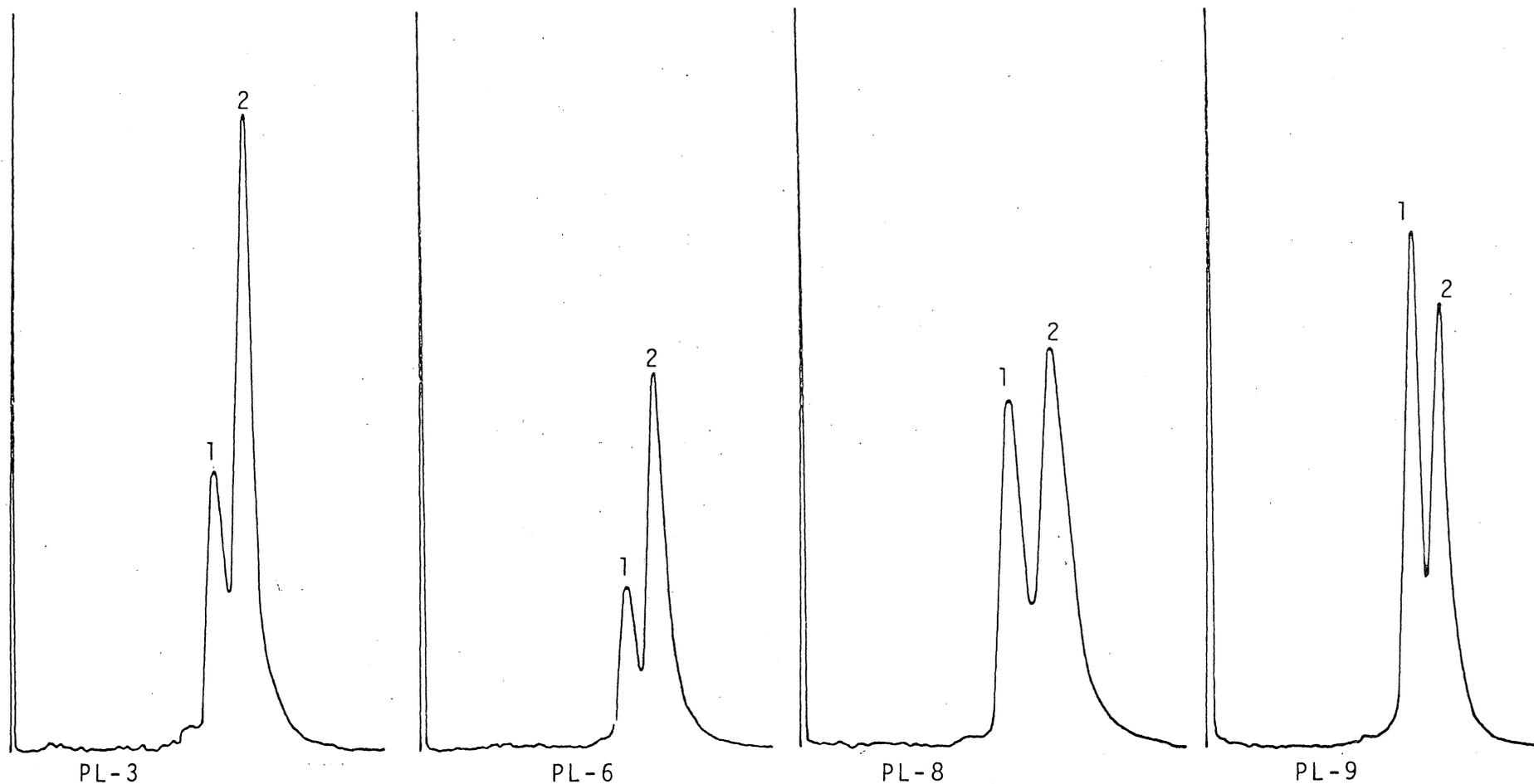


FIGURA 3: Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total, das frações polissacarídicas PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, na forma de alditóis acetatos. (ECNSS-M a 3%/Gas Crom. Q, 180°C).

1. Galactitol hexa-O-acetato
2. Glucitol hexa-O-acetato

TABELA - I

ANÁLISE POR g.l.c.\* DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

Produtos	R <sub>Gal</sub> **	T***	Moles % na Frações Polissacarídicas			
			PL-3	PL-6	PL-8	PL-9
Glucitol	1,13	3,53	67,2	68,0	58,0	45,0
Galactitol	1,00	3,12	32,8	32,0	42,0	55,0

\* Coluna convencional de ECNSS-M a 3% (p/p) em Gas Chrom.Q, a temperatura de 160°C

\*\* Obtido em cromatografia em papel; solvente - Benzeno-n-butanol-piridina-água (1:5:3:3, v/v, fase superior).

\*\*\* Tempos de retenção em relação ao arabinitol pentacetato.

tecidos placentários. Por outro lado, a persistência na relação D-glucose:D-galactose entre PL-3 e PL-6 pode ser devida a um estado de equilíbrio dinâmico das estruturas moleculares presentes quando, então, as velocidades de síntese e de degradação tendem a assumir valores iguais. Este fato portanto, pode ter tornado impossível, no presente trabalho, a verificação experimental do consumo de D-glucose nessa etapa da gestação.

Metilação das Frações Polissacarídicas: Os estudos de metilação revelaram a presença, em PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, de unidades de D-glucose e D-galactose nas formas piranosídicas e ocupando extremidades não redutoras. Além disso, as proporções relativas dos derivados metilados da D-glucose e da D-galactose (Tabela II) confirmam as relações glucose:galactose já verificadas na análise dos produtos da hidrólise ácida das frações (Tabela I).

A análise quantitativa por g.l.c. dos produtos da metanólise das frações polissacarídicas metiladas (na forma de alditol acetatos parcialmente metilados) revelou que PL-3 (Fig. 4) é composta de 4,5 moles% de unidades de D-glucopiranosose e 8,5 moles% de D-galactopiranosose ocupando extremidades não redutoras; 62,3 moles% de unidades de D-glucopiranosose 4-O-substituídas; 11,0 moles% de unidades de D-galactopiranosose 3-O-substituídas, além de 4,9 moles% de unidades de D-glucopiranosose 4,6-di-O-substituídas e 8,8 moles% de unidades de D-galactopiranosose 3,6-di-O-substituídas (Tab. II).

TABELA - II

ANÁLISE POR g.l.c. DOS PRODUTOS DERIVADOS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS METILADAS (\*)

Alditol acetato parcialmente metilado (**)	T (***)	Moles % nas frações polissacarídicas metiladas			
		PL-3	PL-6	PL-8	PL-9
2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Glucitol	1,00	4,5	4,7	4,1	3,5
2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	1,25	8,5	9,0	12,1	15,3
2,4,6-tri- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	2,30	11,0	13,6	17,9	21,8
2,3,6-tri- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Glucitol	2,50	62,3	59,0	49,7	40,8
2,3-di- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Glucitol	5,60	4,9	4,7	4,2	3,5
2,4-di- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	6,60	8,8	9,0	12,0	15,1
Glucose : galactose		71:29	68:32	58:42	48:52

\* Como alditol acetatos parcialmente metilados

\*\* Analisados na coluna convencional de ECNSS-M a 3% (p/p) em gas Chrom. Q, à temperatura de 160°C

\*\*\* Tempos de retenção relativos ao de 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-Glucitol.

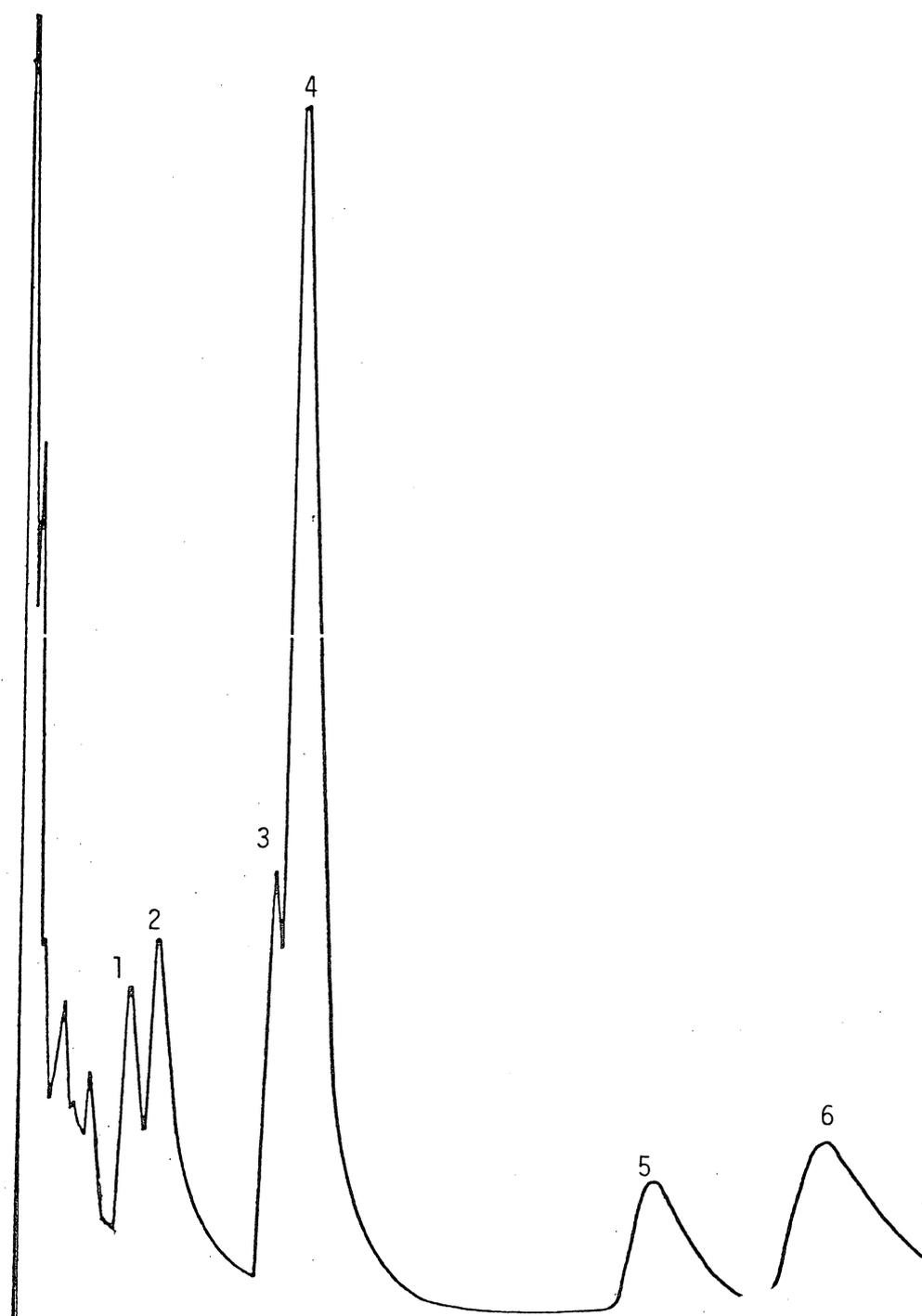


FIGURA 4: Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de metilação da fração polissacarídica PL-3 (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 160°C). Tempos de retenção relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol

1. 2,3,4,6-tetra-O-CH<sub>3</sub>-D-Glucitol
2. 2,3,4,6-tetra-O-CH<sub>3</sub>-D-Galactitol
3. 2,4,6-tri-O-CH<sub>3</sub>-D-Galactitol
4. 2,3,6-tri-O-CH<sub>3</sub>-D-Glucitol
5. 2,3-di-O-CH<sub>3</sub>-D-glucitol
6. 2,4-di-O-CH<sub>3</sub>-D-galactitol

Como pode ser visto, a fração polissacarídica PL-6 difere muito pouco de PL-3. No entanto, PL-8 e PL-9 apresentam variações significativas na porcentagem de seus derivados metilados com relação a PL-3 e PL-6. A fração PL-9 continua tendo unidades de D-glucopiranosose e de D-galactopiranosose ocupando extremidades não redutoras (3,5 moles% e 15,3 moles%, respectivamente); 40,8 moles% de unidades de D-glucopiranosose 4-O-substituídas e 21,8 moles% de unidades de D-galactopiranosose 3-O-substituídas, além das unidades 4,6-di-O- (3,5 moles%) e 3,6-di-O-substituídas (15,1 moles%) de D-glucopiranosose e de D-galactopiranosose, respectivamente. Assim, entre o 6º e o 9º mês de gestação ocorre uma progressiva diminuição no número de unidades de D-glucose (2,3,4,6-tetra-O-; 2,3,6-tri-O- e 2,3-di-O-metil-D-glucopiranosose), o que está de acordo com os dados anteriores. Um fato que deve ser notado nestes dados é que as unidades de D-gluco e de D-galactopiranosose ocupam, ambas, as extremidades não redutoras, assim como as regiões lineares e os pontos de ramificação da(s) molécula(s) das frações estudadas. Além disso verifica-se uma equimolaridade entre o 2,3,4,6-tetra-O- e o 2,3-di-O-metil-D-glucopiranosose e entre o 2,3,4,6-tetra-O- e o 2,4-di-O-metil-D-galactopiranosose; isto nos sugere que as unidades de D-gluco e D-galactopiranosose podem ser constituintes de polímeros distintos. Assim poderíamos propor a hipótese segundo a qual as frações polissacarídicas seriam constituídas por um polímero de glucose e por um polímero de galactose, associados por agregação molecular, e indissociáveis nas condições experimentais. De fato, se tratarmos os dados apresentados na Tabela II de modo inde

pendente, ou seja, isolando os derivados da D-glucose dos derivados da D-galactose (Tab. III), verificamos que a galactana e a glucana postuladas não teriam sofrido nenhuma variação estrutural significativa durante a gestação em bovinos. O que na verdade poderia estar ocorrendo é um decréscimo progressivo, em quantidade absoluta, da glucana entre o 6º e o 9º mês da gestação. Este fato estaria de acordo, por analogia, com a alta concentração de glucose (como malto-oligossacarídeos) verificada nas células sinciciotrofoblásticas de placenta humana durante a gestação e com a ausência desse monossacarídeo na placenta a termo (19). Este decréscimo na quantidade da glucana provavelmente estaria relacionado com seu consumo pelo feto em crescimento, assim como sua utilização pelos próprios nódulos placentários para manter a alta atividade metabólica aí desenvolvida.

Contudo, persiste a necessidade de confirmação experimental da hipótese sobre a independência dos polímeros em PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9. Ora, a remoção enzimática das unidades de D-glucose das frações poderia por em evidência a estrutura de uma galactana (se presente) que seria, então, metilada. A análise comparativa dos dados de metilação obtidos desta galactana com aqueles mostrados na Tabela III, trará novos esclarecimentos. Assim, se esta análise demonstrar identidade estrutural na galactana, antes e depois da remoção total das unidades de glucose, a hipótese sobre a independência dos polímeros estaria preservada.

TABELA - III

ANÁLISE POR g.l.c. DOS ALDITOL-ACETATOS PARCIALMENTE METILADOS DERIVADOS DA <u>D</u> -GLUCOSE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS METILADAS					
Alditol acetato parcialmente metilado	T	Moles % nas frações polissacarídicas metiladas			
		PL-3	PL-6	PL-8	PL-9
2,3,4,6-Tetra- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Glucitol	1,00	6,3	6,8	7,1	7,3
2,3,6-Tri- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Glucitol	2,50	86,9	86,4	85,7	85,3
2,3-Di- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Glucitol	5,60	6,8	6,8	7,2	7,3

ANÁLISE POR g.l.c. DOS ALDITOL-ACETATOS PARCIALMENTE METILADOS DERIVADOS DA <u>D</u> -GALACTOSE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS METILADAS					
Alditol acetato parcialmente metilado	T	Moles % nas frações polissacarídicas metiladas			
		PL-3	PL-6	PL-8	PL-9
2,3,4,6-Tetra- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	1,25	30,0	28,5	28,8	29,3
2,4,6-Tri- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	2,30	38,9	43,0	42,6	41,7
2,4-Di- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	6,60	31,1	28,5	28,6	28,9

Espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da Fração Polissacarídica PL-3:  
 Os estudos de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da fração polissacarídica PL-3 (Fig. 5) confirmam os dados de metilação, bem como a  $\alpha$ -configuração apresentada pela maioria das unidades componentes dos polímeros estudados, o que já havia sido sugerido pelas rotações específicas anteriormente citadas.

As ressonâncias de C-1 das formas piranosídicas da glucose, xilose, galactose, arabinose, metil glucosídeo e metil xilosídeo são sensíveis às configurações anoméricas(29). Por exemplo, o sinal de C-1 do metil  $\alpha$ -D-glucopiranosídeo ( $\delta$ c 100,3 ppm) está em campo mais alto do que o sinal de C-1 do anômero  $\beta$  ( $\delta$ c 104,3 ppm), e o sinal de C-1 do metil  $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $\delta$ c 100,5 ppm) está em campo mais alto do que o sinal de C-1 do anômero  $\beta$  ( $\delta$ c 104,9 ppm), sendo os experimentos realizados em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $33^\circ\text{C}$  (29). Assim, é possível que o sinal em 103,5 ppm do espectro de  $^{13}\text{C}$  de PL-3 seja proveniente de C-1 das unidades  $\beta$ -D-galactopiranosídicas e (ou)  $\beta$ -D-glucopiranosídicas, enquanto que os sinais em 101,5 e 100,52 ppm sejam provenientes de C-1 das unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose e (ou)  $\alpha$ -D-glucopiranosose, pelo fato de que os sinais de C-1 de unidades  $\alpha$ -D-hexopiranosídicas estão em campo mais alto que os sinais de C-1 correspondentes a unidades  $\beta$ -D-hexopiranosídicas. Por esta razão, e analisando os dados da ação da  $\beta$ -amilase (ver adiante) é muito provável que estes sinais, a campo mais alto ( $\delta$ c 101,5 e 100,52 ppm) sejam devidos, principalmente, a C-1 das unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosídicas.

Os sinais  $\delta$ c 82,35 ppm,  $\delta$ c 79,56 ppm e  $\delta$ c 78,02 ppm,

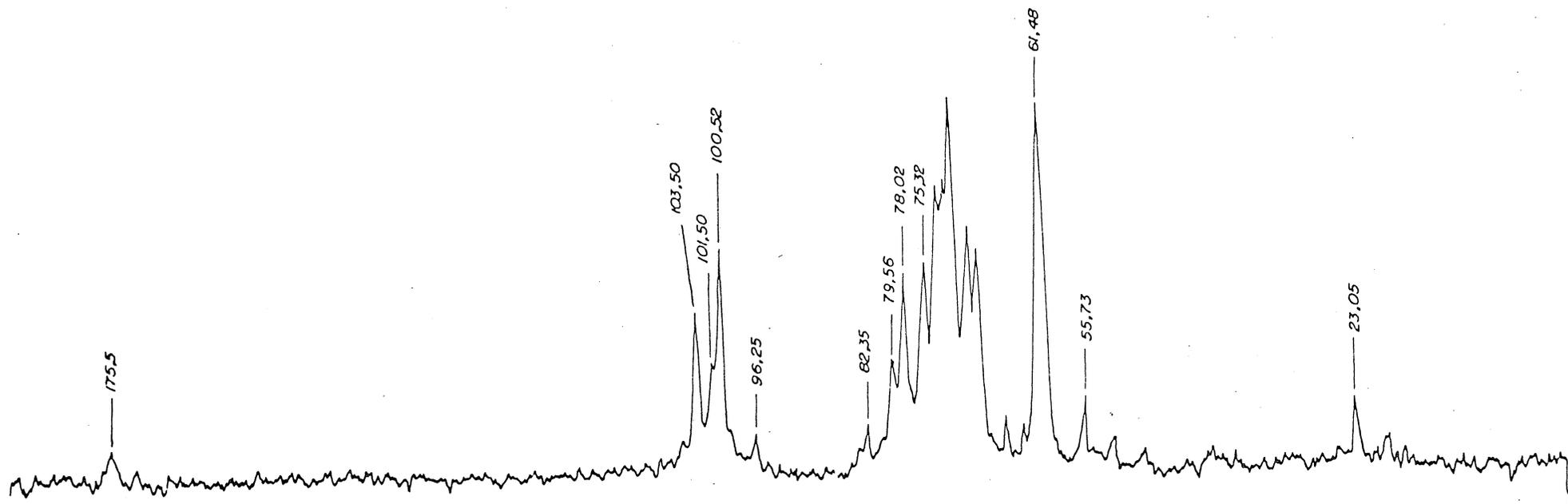


FIGURA 5: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da fração polissacarídica PL-3, a  $33^\circ\text{C}$  em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta_c$ ) foram expressos em (p.p.m), relativos aos TMS externo.

podem ser atribuídos a carbonos O-substituídos, pois se encontram em campo mais baixo do que os sinais de C-2, C-3, C-4 e C-5 das unidades de galactopiranoose e glucopiranoose (24). Como se sabe os deslocamentos químicos dos sinais de ressonância dos átomos de carbono dos polissacarídeos são muito semelhantes 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  $\alpha$ ) (29, 14). Os deslocamentos químicos dos sinais que ocorrem na O-metilação dos 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  $\alpha$  são da ordem de +7 a +11 ppm (22). Estes dados agora analisados em conjunto com os dados de metilação de PL-3 permitem relacionar o sinal a  $\delta_c$  82,35 ppm com C-3 das unidades  $\beta$ -D-galactopiranosídicas O-glicosiladas (o derivado 3-O-metil  $\beta$ -D-galactopiranoose apresenta um sinal de C-3 a  $\delta_c$  83,0 ppm (4)).

O sinal a  $\delta_c$  78,02 ppm, pode ser atribuído a C-4 das unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosídicas, uma vez que, a análise dos produtos de metilação de PL-3 não revelou a presença de unidades de D-galactose-4-O-substituídas. O sinal a 61,48 ppm está relacionado ao C-6 das unidades de galactopiranoose e glucopiranoose.

Os sinais  $\delta_c$  96,25 ppm,  $\delta_c$  79,56 ppm e  $\delta_c$  55,73 ppm podem ser relacionados a presença de hexosaminas, o que foi

determinado quimicamente pelo método de Boas. Enquanto que os sinais  $\delta_c$  23,05 ppm ( $-\text{CH}_3$ ) e  $\delta_c$  175,5 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ ) (13) sugerem que as hexosaminas, cuja presença foi determinada nas frações, encontram-se na forma de N-acetil, uma vez que o grupo N-acetil é facilmente hidrolisado nas condições de hidrólise utilizadas.

Ação da  $\beta$ -amilase sobre a fração PL-9: A fração polissacarídica PL-9, apresentando uma relação galactose : glucose de 55,0 : 45,0, foi submetida à ação da  $\beta$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glucanamiltohidrolase; EC 3.2.1.2), nas condições já descritas em Material e Métodos. Após este tratamento, a análise dos produtos de hidrólise ácida de PL-9, na forma de alditol acetatos (fig. 6) apresentou uma relação galactose : glucose de 80,0 : 20,0 moles%. Este decréscimo na quantidade de D-glucose é indicativo de que as unidades deste monossacarídeo no polímero consumido pela  $\beta$ -amilase estavam unidas através de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha(1-4)$ . Este fato, juntamente com os dados de metilação de PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, permitem propor para a  $\alpha$ -D-glucana presente nas frações, uma estrutura semelhante à do glicogênio. Por outro lado, a quantidade de D-glucose que persistiu na preparação após a ação da  $\beta$ -amilase, é compatível com a dextrina-limite esperada. Além disso, as rotações específicas das frações,  $[\alpha]_D^{25} + 144^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25} + 140^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25} + 123^\circ$  e  $[\alpha]_D^{25} + 105^\circ$ , para PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, respectivamente, são indicativas da presença de alta proporção de unidades  $\alpha$ -D-hexopiranosídicas.

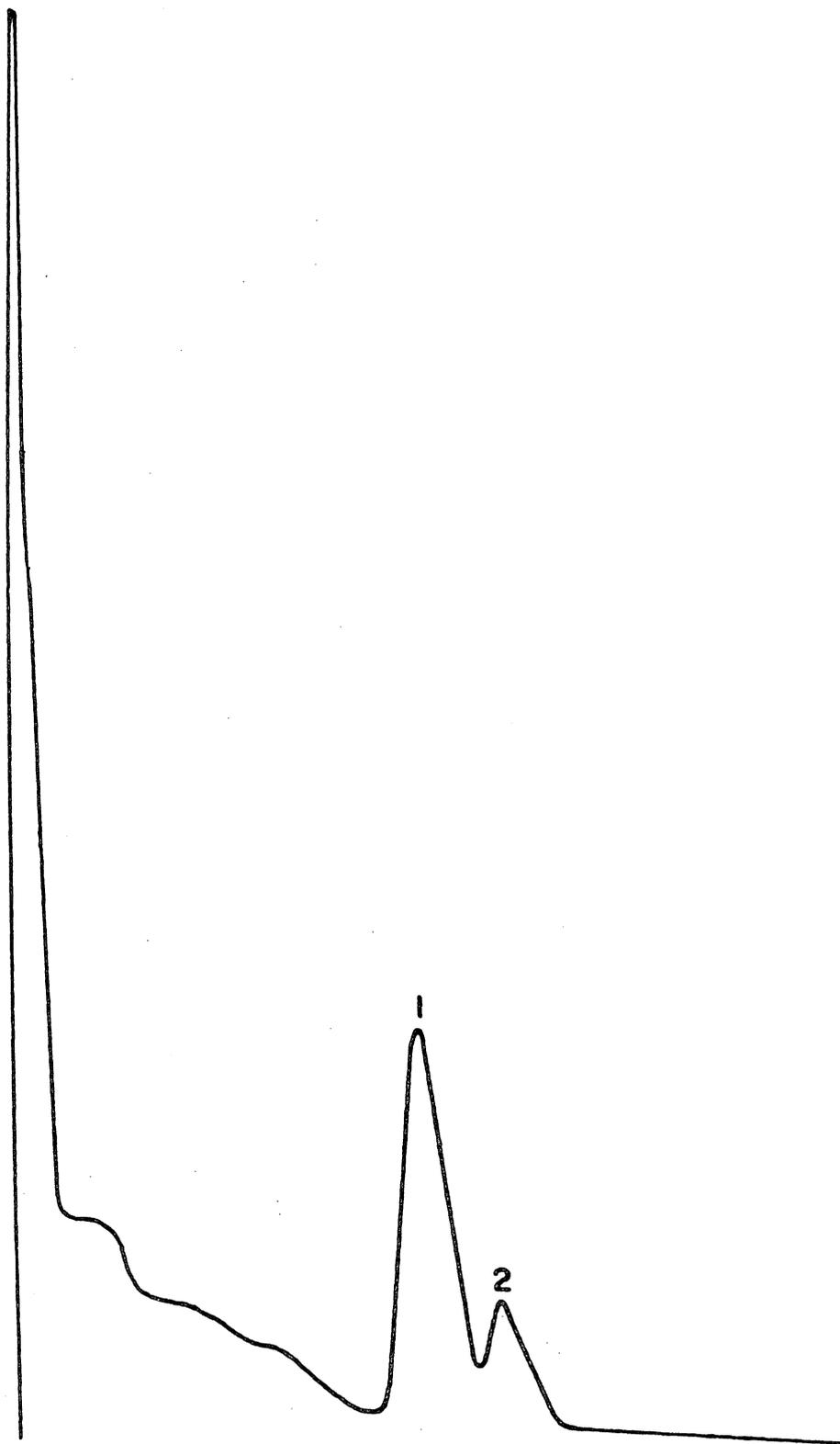


FIGURA 6: Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total, seguida de redução e acetilação, da fração polissacáridica PL-9, após tratamento com  $\beta$ -amilase. (ECNSS-M a 3%/Gas chrom. Q, 180°C).

1. Galactitol hexa-O-acetato
2. Glucitol hexa-O-acetato

Ação da Protease sobre a Fração PL-9: A fração polissacarídica PL-9, contendo 55 moles% de D-galacto e 45 moles% de D-glucopiranosose, foi submetida à ação de uma protease contendo atividade glucosidásica (Protease tipo II, Sigma Chemical Co.) nas condições já descritas em Material e Métodos. Após o tratamento com a enzima, a análise dos produtos da hidrólise ácida de PL-9 revelou a presença apenas de D-galactose (Fig. 7) Assim, a atividade glucosidásica presente na protease serviu de instrumento para permitir o isolamento de um polissacarídeo composto de D-galactose presente nas frações polissacarídicas, o que não havia sido possível por outros métodos.

A rotação específica da D-galactana,  $[\alpha]_D^{25} +41^\circ$  (c, 0,5 em água), é superior àquela de  $+21^\circ$  relatada para uma  $\beta$ -D-galactopiranosana (16). Assim sendo, desde que as unidades de galactose estão presentes como D-enantiômeros, pode ser sugerida a presença de uma pequena proporção de unidades  $\alpha$ -D-galactopiranosídicas.

Oxidação pelo periodato do polímero de galactose obtido de PL-9 e ácido fórmico liberado: Os dados de consumo de periodato (0,6 mol/mol de hexose anidra) (Fig. 8) e ácido fórmico liberado (0,3 mol/mol de hexose anidra) estão de acordo com os dados de metilação obtidos para o polímero de galactose- (ver adiante). Estes dados permitem concluir que existem, na estrutura do polissacarídeo, 30,0 moles% de unidades que consomem 2 moles de periodato/mol de hexose anidra e liberam 1 mol de ácido fórmico, tais como unidades apresentando liga-

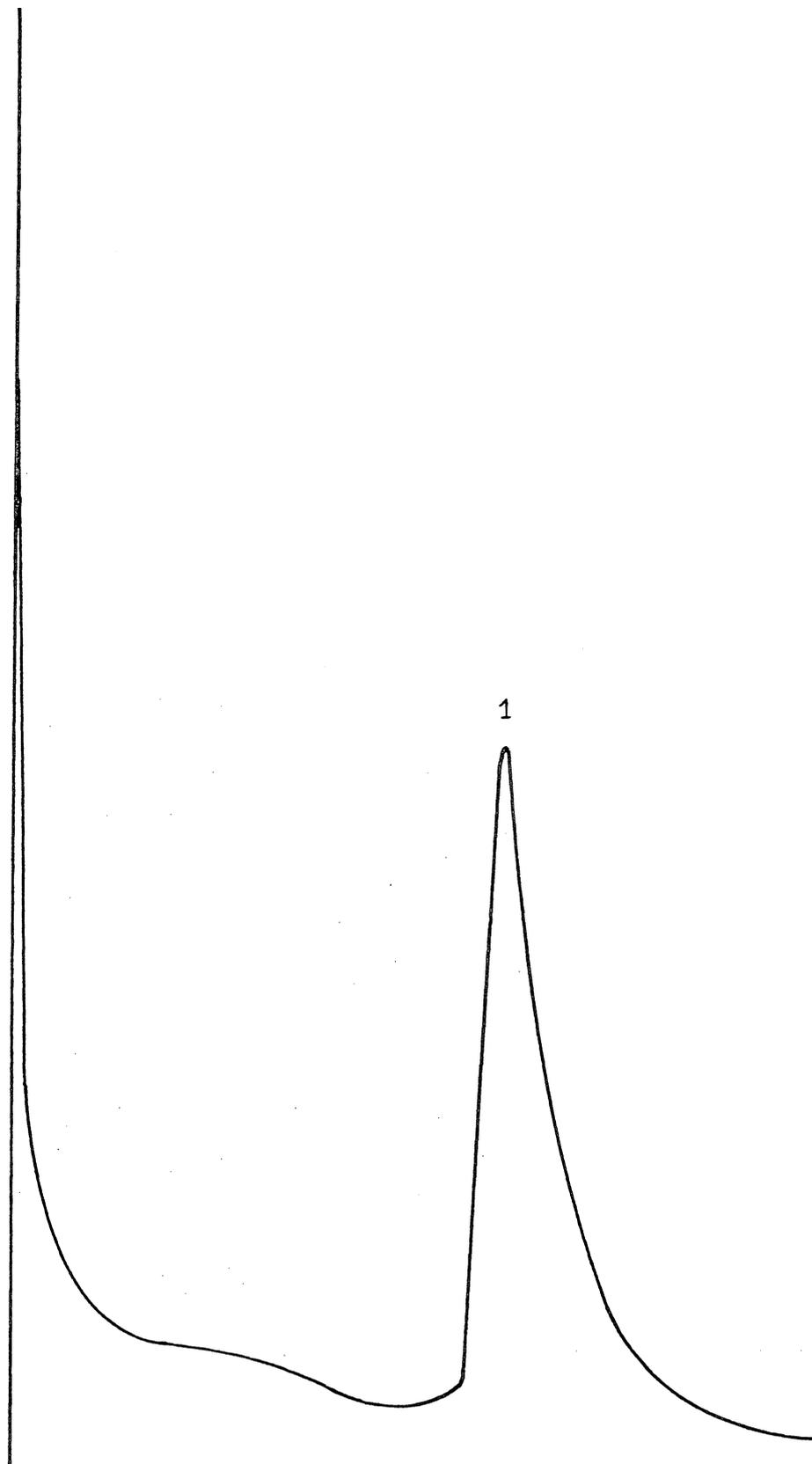


FIGURA 7: Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total da fração polissacarídica PL-9, após tratamento com protease. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 180°C).

1. Galactitol hexa-O-acetato

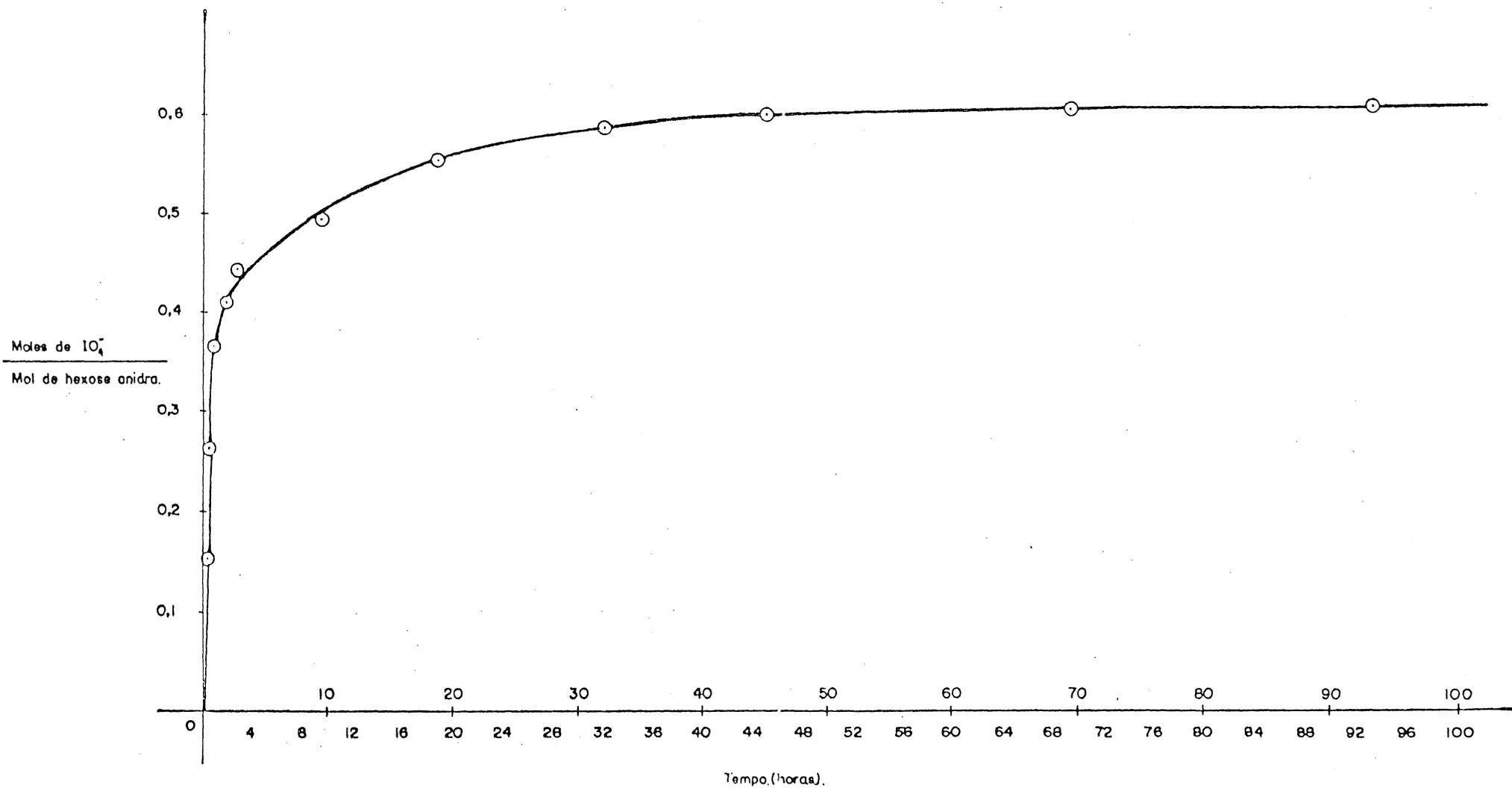


FIGURA 8: Gráfico correspondente à oxidação com m-periodato de sódio do polímero de galactose obtido da fração polissacarídica PL-9.

ções glicosídicas do tipo (1→6) (cadeias lineares) e(ou) unidades terminais não redutoras. Por outro lado, estes resultados permitem excluir, no polímero, a presença de unidades que consomem periodato sem, contudo, liberar ácido fórmico, como unidades piranosídicas apresentando ligações glicosídicas dos tipos (1→2) e(ou) (1→4). Além disso, fica evidente que há 70,0 moles% de unidades galactopiranosídicas não suscetíveis à oxidação com o periodato, 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).

Análise tipo Smith dos grupos Terminais do Polímero de Galactose obtido de PL-9: Os resultados obtidos da degradação tipo Smith (33,8 moles% de glicerol tri- e 66,2 moles% de galactitol hexa-acetato;(Tab. IV) eliminaram a possibilidade de presença, no polímero, de unidades galactopiranosídicas unidas por ligação glicosídica do tipo (1→4), em função da ausência de treitol tetra-acetato. Por outro lado, os dados indicam a possibilidade de ser o polímero formado por unidades não suscetíveis à oxidação com periodato na proporção de 66,2%, como aquelas envolvidas em ligações glicosídicas do tipo (1→3) e pontos de ramificação, como já referido, além de 33,8% de unidades que liberam glicerol. A porcentagem de glicerol (33,8 moles%) liberada durante o processo pode ser atribuída, no caso específico, à presença de cadeia(s) linear(es) constituída(s) por unidades galactopiranosídicas unidas por ligações glicosídicas do tipo (1→6) e(ou) unidades

TABELA - IV

ANÁLISE POR g.l.c. DOS PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO TIPO SMITH DO  
POLÍMERO DE D-GALACTOSE OBTIDO DE PL-9

Alditol acetato *	R <sub>Gal</sub> **	M%
Glicerol - tri	1,54	33,8
Galactitol - hexa	1,00	66,2

\* Coluna de ECNSS-M a 3% (p/p) em Gas Chrom Q, a 160<sup>o</sup>C, e arabinitol pentacetato como referência interna.

\*\* Obtidos por cromatografia em papel, solvente - Benzeno-n-butanol-piridina-água (1:5:3:3, v/v, fase superior).

terminais não redutoras. Esta proposição é compatível com os dados de consumo de periodato e ácido fórmico liberado do polissacarídeo durante o processo oxidativo, pois a porcentagem de unidades que liberam ácido fórmico (30,0 moles%) durante a oxidação com periodato corresponde ao número de unidades produzindo glicerol (33,8 moles%) na análise dos grupos terminais. Deve ser ressaltado que pelo consumo de periodato e ácido fórmico liberado do polímero não há evidências da presença de ligação glicosídica do tipo (1→2) nem de unidades com ramificações nos carbonos C-2 e C-6, o que foi definitivamente afastado pelo estudo de metilação do polímero (ver adiante).

Assim, os dados de oxidação com periodato e da degradação tipo Smith, analisados em conjunto, sugerem para a galactana a seguinte composição: 30,0 moles% de unidades terminais não redutoras e(ou) unidades apresentando ligações glicosídicas do tipo (1→6) lineares e 70,0 moles% de unidades não suscetíveis à oxidação com periodato. Um polissacarídeo com essa composição produziria, por uma análise teórica dos grupos terminais, 30,0 moles% de glicerol (sendo 33,8 moles% obtidos experimentalmente) e 70,0 moles% de galactitol (sendo 66,2 moles% obtido experimentalmente).

Metilação do Polímero de Galactose obtido da fração PL-9 por ação da protease: O polímero obtido de PL-9 foi metilado como já descrito em Material e Métodos. A análise quantitativa por g.l.c. dos produtos da metanólise do polissacarídeo me-

TABELA - V

ANÁLISE POR g.l.c.\* DOS PRODUTOS DERIVADOS DA METILAÇÃO DO  
POLÍMERO DE D-GALACTOSE OBTIDO DE PL-9.

Alditol acetato parcialmente metilado	T **	Moles%
2,3,4,6-Tetra- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	1,25	30,0
2,4,6-Tri- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	2,30	39,5
2,4-Di- <u>O</u> -CH <sub>3</sub> - <u>D</u> -Galactitol	6,60	30,5

\* Analisados na coluna convencional de ECNSS-M a 3% (p/p) em gás "Chrom. Q", a temperatura de 160°C

\*\* Tempos de retenção relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-Glucitol.

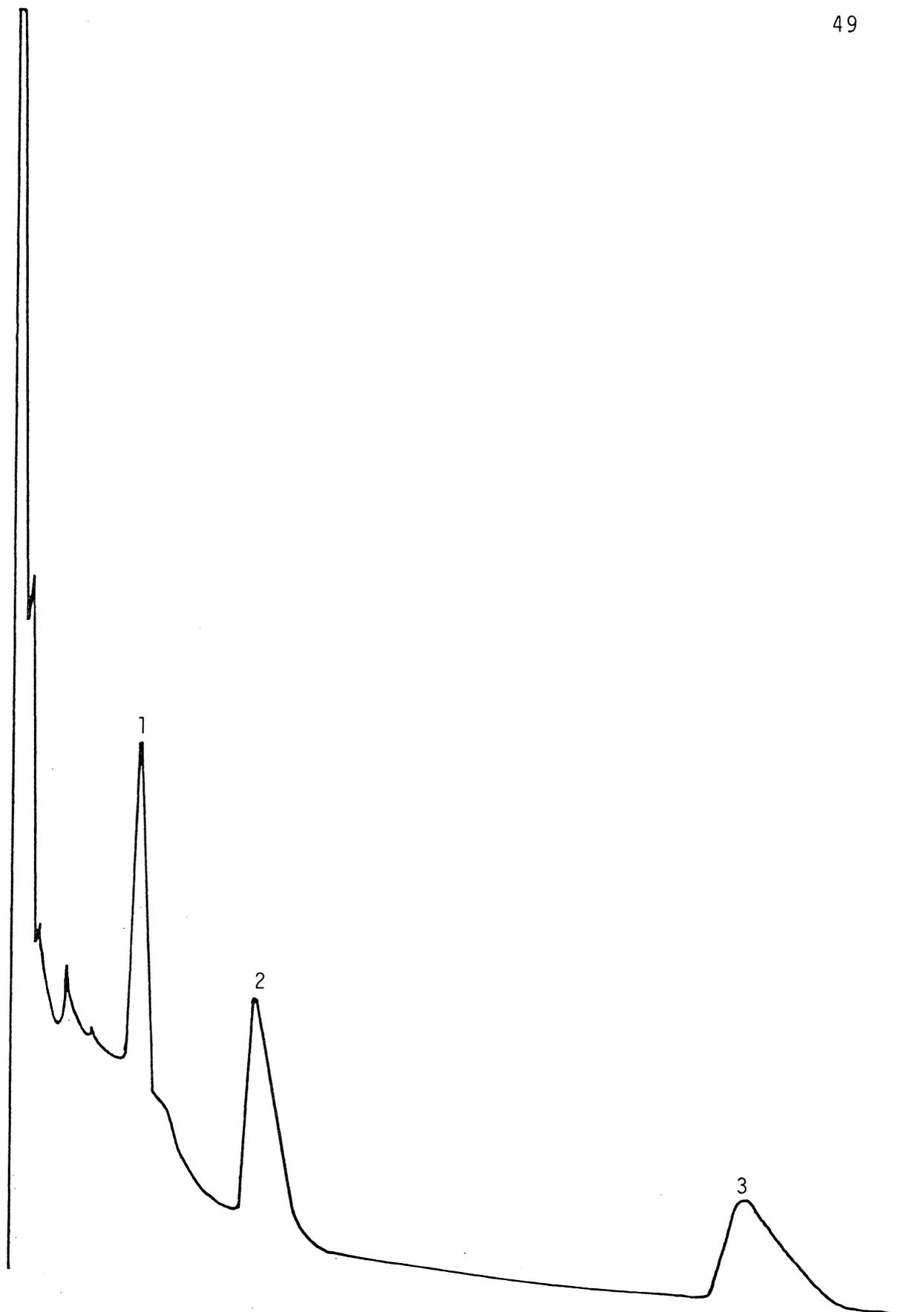


FIGURA 9: Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de metilação do polímero de D-galactose obtido de PL-9, após tratamento desta fração com uma protease, contendo atividade glucosidásica (ECNS-M a 3%/Gás Chrom. Q., 160°C). Tempos de retenção relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

1. 2,3,4,6-tetra-O-CH<sub>3</sub>-D-Galactitol
2. 2,4,6-tri-O-CH<sub>3</sub>-D-Galactitol
3. 2,4-di-O-CH<sub>3</sub>-D-Galactitol

tilado, na forma de alditol acetados parcialmente metilados (Fig. 9) revelou que a molécula é composta de 30,0 moles% de unidades de D-galactopiranosose nas extremidades não redutoras da molécula; 39,5 moles% de unidades de D-galactopiranosose 3-0-substituídas e 30,5 moles% de unidades de D-galactopiranosose 3,6-di-0-substituídas (Tabela V).

Como pode ser observado, a estrutura do polímero de galactose não sofreu variação significativa após a remoção enzimática das unidades de D-glucose da fração PL-9 (Tabela III e V). Este fato somado à ausência de derivados metilados da D-glucose entre os produtos de hidrólise do polímero, não descarta a idéia sugerida sobre a independência das duas entidades macromoleculares presentes nas frações polissacarídicas estudadas. Assim, a primeira hipótese é que em PL-3, PL-6, PL-8 e PL-9, existam dois polissacarídios, uma glucana, semelhante ao glicogênio, e uma galactana, unidas por agregação molecular e que mostraram-se indissociáveis nas condições testadas no presente trabalho.

Entretanto, os dados experimentais não excluem duas outras possibilidades que devem ser consideradas, e que serão posteriormente investigadas. A segunda é a ligação das duas macromoléculas através da proteína; neste caso, a proteína presente em todas as frações, e sempre eluída das colunas cromatográficas juntamente com os polissacarídeos, poderá estar servindo de ponto de ligação entre os dois polímeros. A terceira hipótese é que a galactana, estivesse ligada à glucana por meio de ligações glicosídicas num pequeno número de pontos, o que não alteraria de modo significativo os resultados de metilação antes e após o tratamento com a protease.

Esta galactopirranana ramificada associada à glucana, cuja ocorrência ainda não havia sido relatada em placenta bovina, é semelhante àquelas já encontradas durante os processos reprodutivos de outros animais, porém seu verdadeiro papel biológico, no caso específico do presente trabalho, permanece desconhecido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALBERSHEIN, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res., 5:340-5, 1967.
02. AMARAL, D.; KELLY, F.F.; HORECKER, B.L. Galactose oxidase of Polyporus circinatus. Meth. Enzimol., 2:87-92, 1966.
03. ANDERSON, D.M.W.; GREENWOOD, G.T.; HIRST, E.L. Physicochemical studie on starches. Part III - The oxidation of starches by potassium metaperiodate. J.Chem.Soc. 225-231, 1955.
04. ANTONOPOPULOS, C.A. A modification for the determination of sulphates in mucopolysaccharides by the benzidine method. Acta Chem.Scand., 16:1521-1522, 1962
05. BACON, J.S.D. & BELL, D.J. Fructose e Glucose in the blood of the foetal sheep. Biochem.J., 42:397-405, 1984.
06. 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.
07. BERNARD, C. De la maturé glycogène considerée comme condition de developpement certains tissus chezde le foetus avan't l'a partition de la fonction glicogénique du foie. J. Physiol. Homme Anima. 2:326, 1859.
08. BISSONETTE, J.M.; BLACK, J.A.; WICKHAM, W.K.; ACOTT, M.K. Glucose uptake into plasma membrane visicles from the maternal surface of human placenta. J.Membr.Biolo., 58(1):75-80, 1981. Biol.Abstr., 71(12):8325, 1981. Ref. 79399. Resumo.
09. BOAS, N.F. Method for the determination of hexosamines in tissues, J.Biol.Chem. 24:553-63, 1953.
10. BOUVENG, H. & LINDBERG, B. Hydrolysis of methylated polysaccharides. Meth.Carbohydr.Chem., 5:296-297, 1965.

11. CAPKOVA, A. & JIRASEK, H.E. Glycogen reserves in organs of human fetuses in the first half of pregnancy. Biol. Neonat., 13:129-142, 1968. Biol.Abstr., 51:4304, 1970. Ref. 44356. Resumo.
12. DAHLQVIST, A. A determination of maltose and isomaltose activities with a glucose oxidase reagent. Biochem.J., 80:547-555, 1961.
13. DILL, K.; LANNOM, H.K.; DENARIE, M.; LACOMBE, J.M.; PAIVA, A.A. Structural, dynamic, e metal-ion binding studies of the core glycopeptides  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalNAc  $\rightarrow$  Ser, Thr by  $^{13}\text{C}$ -N.M.R. spectroscopy. Carbohydr.Res., 142:11-20, 1985.
14. DORMAN, D.E.; ANGYL, S.J. & ROBERTS, J.D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectr. of some inositols and their O-methylated derivatives. J.Amer. Chem.Soc., 92:1351-1354, 1970.
15. DRIESSEN, L.F. Veber Glycogen in der Placenta. Arch. Gynaek., 82:278, 1907.
16. DUARTE, J.H. & JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail Strophocheilus oblogus. Carbohydr.Res. 16:327-335, 1971.
17. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed polysaccharides on cellulose acetate. Can.J.Chem., 46:3079-3084, 1968.
18. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal.Chem., 28:350-356, 1965.
19. FISHER, J.S. & LAINE, A.R. Accumulation of malto-oligosaccharides in the Syncytiotrophoblastic cells of first-trimester human placentas. J.Biochem., 200:93-98, 1981.
20. GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv.Carbohydr. Chem.Biochem., 35:128-334, 1978.
21. GOMES, V.M.V. Bioquímica clínica; manual de práticas. Curitiba, UFPR, 1975. p.148-9.
22. GORIN, P.A.J. Assignment of signals of the carbon-13 magnetic resonance spectrum of a selected polysaccharide: comments on methodology. Carbohydr.Res., 39:3-10, 1975.
23. 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. 55:21-33, 1977.

24. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can.J.Chem., 53:1212-1223, 1975..
25. GORIN, P.A.J.; PREVIATO, J.O.; PREVIATO, M.L.; TRAVASSOS, L.R. Structure of the D-mannan and D-arabino-D-galactan in Crithidia fasciculata: change in proportion with age of culture. J.Protozool. 26:473-478, 1979.
26. GROB, K. & GROB Jr, K. Isothermal analysis on capillary columns without stream splitting. J.Chromatogr., 94:53-54, 1974.
27. HAGERMAN, D.D.; ROUX, J.; VILLEE, C.A. Studies of the mechanism of fructose production by human placenta. J.Physiol., 146:98-104, 1959.
28. HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J.Biochem. 55:205-208, 1964.
29. HALL, L.D. & JOHNSON, L.F. Chemical studies by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy: some chemical shifts dependencies of oxygenated derivatives. J.Chem.Soc.Chem.Communic.:509-510, 1969.
30. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: General procedures. Meth.Carbohydr.Chem., 5:357-361, 1965.
31. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J.Chem.Soc., 107:8-16, 1915.
32. HOET, J.P. Glycogène placentaire et gestation. In: International Physiological Congress, XIX, Montreal, 1953. Abstracts of communications, p.469.
33. HORSTMANN, J.H. Der Galaktogengehalt der Eier von Lymnea stagnalis warend der Embryonaleutwicklung. Biochem. Z., 328:342-347, 1956.
34. HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved method for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J.Chem.Soc.: 1702-1706, 1950.
35. HUGGETT, A.S.G. Maternal control of placenta glycogen. J.Physiol., 67:360, 1929.

36. HUGGETT, A. St.G. Problems of sugar transport in the placenta of the ungulate. In: FLEXNER, L.B. ed. Gestation. Transactions of the first conference March 9, 10 and 11, 1954, Princeton, N.J. New York, Josiah Macy, Jr. Foundation, 1955. Secção 2. Biol.Abstr., 29:2115, 1955. Ref. 21261. Resumo.
37. HUGGETT, A.St.G. Carbohydrate metabolism in the placenta and fetus. Brit.Med.Bull., 17:122-6, 1961. Chem.Abstr., 57:2721, 1962. Resumo.
38. HUGGETT, A.S.G. & MORRISON, S.D. Placental glycogen in the rabbit. J.Physiol., 129:68, 1955.
39. IACOMINI, M.; DUARTE, H.S.; DUARTE, M.E.R.; DUARTE, G.R.; FONTANA, J.D.; DUARTE, J.H. Degradation of the egg masses galactan during the embryonary development of the snail Biomphalaria glabrata. Arq.Biol.Tecnol., 23: 329-335, 1980.
40. KORNFIELD, R & BROWN, D.J. The activity of some enzymes of glycogen metabolism in fetal and neonatal guinea pig liver. J.Biol.Chem., 238:1604-1607, 1962.
41. LACOMBE FEIJÕ, M.A. Estudo sobre a estrutura e a biodegradação dos polissacarídeos componentes da massa de ovos do molusco Ampullarius sp. (Pelotas). Curitiba, 1982. 66p. Tese. Doutor em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.
42. LACOMBE FEIJÕ, M.A. & DUARTE, J.H. Some structural studies on the fucogalactan from egg masses of the snail Ampullarius sp. Carbohyd.Res., 44:241-249, 1957.
43. LACOMBE FEIJÕ, M.A. & VIEIRA LOPES, L.C Polissacarídeos contendo galactose isolados de placenta e fígado fetal no 4º mês de gestação em bovinos. Arq.Biol.Tecnol., 27 (1):9-13, 1984.
44. LACOMBE FEIJÕ, M.A.; DUARTE, J.H.; MACKENZIE, S.L. GORIN, P.A.J. Structure and biodegradation of the polysaccharide components of egg masses isolated from snails of an Ampullarius species. Carbohyd. Res, 111:105-112, 1982.
45. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, K.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol.Chem., 193:265-75, 1951.
46. MANNERS, D.J. & WRIGHT, A.  $\alpha$ -1,4- glucosans. Par XIII. Determination of the average chain length of glycogens by  $\beta$ -amylolysis. J.Chem.Soc., \_\_\_:1597-1962, 1962.
47. MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. Porto Alegre, R.S. Organização Sulina de representações, 1975. p.213-215.

48. MAY, F. Beitrag zur des Tierischen. Z.Biol., 91:215-220, 1931.
49. MAY, F. Chemische und biologische Untersuchungen über Galaktogen. Z.Biol., 95:401-430, 1934.
50. NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem. 153:375-380, 1944.
51. NEUMULLER, O. & VASSEUR, E. The influence of pH on the periodate oxidation of carbohydrates. Arkiv Kemi, 5: 235-245, 1953.
52. SAWARDEKER, J.S.; SLONECKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal.Chem. 37:1602-4, 1965.
53. SELVENDRAN, R.R.; MARCH; J.F.; RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal.Biochem., 96:282-92, 1979.
54. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J.Biol.Chem., 160:61-68, 1945.
55. STAUB, M.A. Removal of proteins. Sevag Method. Meth. Carbohydr.Chem., 5:5-6, 1965.
56. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatogram by use of dipping reagents. Nature, 166:444-455, 1950.
57. VILLEE, C.A. Biochemical aspects of the mamalian placenta. In: The Biochemistry of animal development. New York, Academic Press, 1976. v.2, p.385-412.
58. VILLEE, C.A. The intermediary metabolism of human foetal tissues. Cold.Spring.Harbor.Symp.Quant.Biol. 19:168, 1954.
59. VILLEE, C.A. & HAGERMAN, D.D. Effect of oxygen deprivation on the metabolism of foetal and adult tissues. Am.J. Physiol., 194:457-464, 1958.
60. YARIMAGAN, H.S. & BOR, N.M. Effects of epinephrine on guinea pig placental glycogen metabolism and on cellular cyclic AMP. Biochem.Med., 25(2):125-134, 1981. Biol. Abstr., 72(7):4969, 1981. Ref. 47799.
61. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. Methods Carbohydr.Chem., 2:211-215, 1963.