

CIRENE LESNIEWSKI DELGOBO

Estudo Parcial do Polissacarídeo do Exsudato de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco)

Tese apresentada ao Departamento de Bio-
química da Universidade Federal do Paraná,
visando à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

CURITIBA

1993

CIRENE LESNIEWSKI DELGOBO

Estudo Parcial do Polissacarídeo do Exsudato de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco)

Tese apresentada ao Departamento de Bio-
química da Universidade Federal do Paraná,
visando à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

CURITIBA
1993

ESTUDO PARCIAL DO POLISSACARÍDEO DO EXSUDATO DE
Anadenanthera colubrina (ANGICO BRANCO)

POR

CIRENE LESNIEWSKI DELGOBO

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Dr. Marcello Iacomini- Orientador

Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte

Dra. Joana Lea M. Silveira Ganter

Curitiba, 1º de Dezembro de 1993.

TESE ORIENTADA PELOS PROFESSORES:

DR. MARCELLO IACOMINI

DR. PHILIP ALBERT JAMES GORIN.

Vos meus pais: Domingos e Bitória
com gratidão

Nós agora vemos como por um espelho,
em enigma; mas então veremos face a
face. Agora conheço em parte; mas
então hei de conhecer perfeitamente,
como eu mesmo sou conhecido.

1 Cor 13, 12.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Mestre de todos os mestres, pela minha vida e pela saúde que me permitiu realizar este estudo.

Ao professor Dr. Marcello Iacomini, que me acolheu muito bem no seu laboratório, pela valiosa orientação, incentivo, amizade e principalmente pelo seu constante otimismo, com o qual tudo se tornou menos difícil.

Ao Dr. Giangiacomo Torri e ao Instituto Ronzoni, em Milão (Itália), pelas análises de ^{13}C -n.m.r. e de ^1H -n.m.r..

À professora Fany e a toda a sua equipe, pelos vários empréstimos concedidos.

À professora Maria Eugênia Duarte e a Miguel pelos empréstimos, informações e auxílios prestados.

Ao amigo Guilherme Gutiérrez, com quem pude compartilhar um pouco da minha vida, minha gratidão pela sua amizade e companhia.

À colega de turma Juliana Menestrina, pela simpatia e amizade, especialmente no início de todo esse caminho que percorremos juntas.

Ao aluno de Iniciação Científica, César Tischer pelos vários auxílios técnicos prestados e pela sua amizade.

A Pedro Ramos, pelas várias impressões dos textos

provisórios desta tese e pelo seu constante apoio.

A todos os professores que ministraram cursos, não somente pelo conhecimento que transmitiram, mas também pelo modelo de seriedade e dedicação que assumiram.

Aos professores Armando Servi, do departamento de Botânica e Carlos Roderjan da Escola de Floresta, pela identificação do vegetal em estudo. Ao professor Gert Hatschbach, diretor do Museu Botânico, pelas fontes bibliográficas e informações sobre o mesmo.

Ao aluno de Iniciação Científica, Alexandre Pinheiro Lima, pela confecção de alguns desenhos.

Ao colega Marcos Machado, pela amizade, bom-convívio, e frequente incentivo, bem como aos demais colegas de laboratório.

À Telma e toda a equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela atenção e eficiente colaboração prestadas.

Aos demais professores, colegas pós-graduandos, alunos de iniciação científica, secretárias e demais funcionários do Departamento de Bioquímica, pela amizade e pelos diversos auxílios prestados.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ESQUEMAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SIGLAS E FÓRMULAS	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1- INTRODUÇÃO	01
1.1 - Noções gerais sobre as gomas	01
1.2 - Arabinogalactanas de <i>Acácias</i>	07
1.3 - Arabinogalactanas de outros gêneros	22
1.4 - Exsudatos que não são arabinogalactanas	27
1.5 - Algumas propriedades industriais das gomas	29
2.0 - OBJETIVOS	33
3.0 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL	35
3.1 - Métodos analíticos gerais	35
3.1.1- Medições de pH	35
3.1.2- Liofilizações	35
3.1.3- Evaporações	35
3.1.4- Dosagens por colorimetria	35
3.1.4.1-Dosagem de proteínas	36
3.1.4.2-Dosagem de açúcares totais	36

3.1.4.3-	Dosagem do ácido urônico	36
3.1.5-	Métodos cromatográficos	36
3.1.5.1-	Cromatografia em papel	36
3.1.5.2-	Cromatografia de gel permeação	37
3.1.5.3-	Cromatografia líquida-gasosa	38
3.1.6-	Hidrólise ácida total	39
3.1.7-	Redução e acetilação	39
3.1.8-	Teor de umidade	40
3.2-	Coleta e preparação da amostra	41
3.3-	Obtenção do polissacarídeo original	41
3.4-	Metilação do polissacarídeo	42
3.5-	Metanólise dos polissacarídeos	44
3.6-	Hidrólises ácidas parciais	45
3.7-	Degradação sequenciada de Smith	46
3.8-	Isolamento e purificação do ácido aldobiurônico	47
3.9-	Identificação do ácido aldobiurônico	48
3.10-	Cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa (g.l.c-m.s.)	49
3.11-	Análise por ressonância nuclear magnética (r.n.m.) de carbono treze e de próton.	50
3.11.1-	Análise por r.n.m. de carbono treze	50
3.11.2-	Análise por r.n.m. de próton	51
4.0-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1-	Descrição da planta	52
4.2-	Polissacarídeo original	53
4.3-	Ácido aldobiurônico	62

4.4-	Hidrólises Ácidas parciais	74
4.5-	Degradações sequenciadas de Smith	91
4.6-	Determinação do peso molecular aproximado	103
5.0-	CONCLUSÕES	109
6.0-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE FIGURAS

I-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do polissacarídeo original	59
II-	Curva de eluição do ácido aldobiurônico	64
III-	Espectro de ^1H -n.m.r. do ácido aldobiurônico	67
IV-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do ácido aldobiurônico	69
V-	Fórmula estrutural do ácido aldobiurônico	70
VI-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. DEPT do ácido aldobiurônico	72
VII-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. INVERSO do aldobiurônico	73
VIII-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do polissacarídeo A	79
IX-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. DEPT do polissacarídeo A	82
X-	Espectro de ^1H -n.m.r. do polissacarídeo A	83
XI-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do polissacarídeo B	85
XII-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do polissacarídeo original, A e B	87
XIII-	Espectro de ^1H -n.m.r. do polissacarídeo B	88
XIV-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do polissacarídeo I	95
XV-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do polissacarídeo II	98
XVI-	Espectro de ^{13}C -n.m.r. DEPT do polissacarídeo II	101
XVII-	Espectros de ^{13}C -n.m.r. dos polis. original, I e II	102
XVIII-	Determinação do peso molecular dos polissacarídeos	104
XIX-	Perfil de eluição dos polissacarídeos A e B	106
XX-	Perfil de eluição dos polissacarídeos I e II	107

LISTA DE ESQUEMAS

I- Purificação e composição do polissacarídeo original	54
II- Produção e purificação do ácido aldobiurônico	63
III-Produção dos polissacarídeos A e B	75
IV -Produção dos polissacarídeos I e II	92

LISTA DE TABELAS

I- Análise por metilação do polissacarídeo original.	56
II- Composição em monossacarídeos dos polissacarídeos original, A, B e dos sobrenadantes etanólicos A1 e B1.	76
III-Composição em monossacarídeos dos polissacarídeos original, I e II e dos açúcares álcoois.	93

LISTA DE SIGLAS E FÓRMULAS

A* - Polissacarídeo obtido após uma hora de hidrólise ácida parcial (H_2SO_4 até pH 1.5 a $100^{\circ}C$), por precipitação etanólica.

A1- Sobrenadante etanólico, obtido após precipitação etanólica do produto de hidrólise ácida parcial de uma hora.

$AgNO_3$ - Nitrato de prata.

Ag_2CO_3 - Carbonato de prata.

Ag_2O - Óxido de prata.

α - Denota anomericidade alfa.

$[\alpha]_D$ - Rotação específica.

Araf- Arabinofuranose.

B* - Polissacarídeo obtido após duas horas de hidrólise ácida parcial (H_2SO_4 até pH 1.5 a $100^{\circ}C$), por precipitação etanólica.

B1- Sobrenadante etanólico, obtido após precipitação etanólica do produto de hidrólise ácida parcial de duas horas.

Ba_2CO_3 - Carbonato de bário.

β - Denota anomericidade beta.

c.p.- Cromatografia em papel.

^{13}C -n.m.r.- Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono treze.

CH_3 -Iodeto de metila.

Cl-4B- Gel de agarose a 4% que sofreu "cross-linking".

* Polissacarídeos

cm- Centímetro.

Co⁶⁰- Cobalto sessenta.

CuSO₄- Sulfato de cobre.

c.p.- Cromatografia em papel.

D₂O- Óxido de deutério.

DMSO- Dimetil sulfóxido.

δ (Delta)- Deslocamento químico.

DEPT- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

D-Gal- Galactose pertencente à série D.

d.i- Diâmetro interno.

E.n.r.- Extremidade não redutora.

g- Grama.

Gal- Galactose.

g.l.c.- Cromatografia líquida-gasosa.

g.l.c.-m.s.- Cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Glc pA- Ácido glucopiranosilurônico.

¹H-n.m.r.- Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de próton.

H₂SO₄ 0,5 N- Ácido sulfúrico 1/2 (meio) Normal.

INVERSE- (Inversa) - H,X, correlation via ¹H detection.

I* Polissacarídeo obtido por uma degradação de Smith (hidrólise branda após o primeiro ciclo de oxidação por periodato).

II* Polissacarídeo obtido após duas degradações de Smith (hidrólise branda após o segundo ciclo de oxidação por periodato).

K_{av} - Coeficiente de partição, calculado a partir do volume total da coluna, volume de eluição e volume morto, pela fórmula:

$$K_{av} = V_t - V_e / V_t - V_o.$$

KBr- Brometo de potássio.

L-Rha- Ramnose pertencente à série L.

MH_z- Mega Hertz

mg- Miligrama.

ml- Mililitro.

NaBH₄- Boroidreto de sódio

NaCl- Cloreto de sódio.

NaIO₄- Periodato de sódio.

NaOH- Hidróxido de sódio.

Na₂SO₄- Sulfato de sódio.

nm- Nanômetro.

pH- Potencial hidrogeniônico

ppm- Parte por milhão

PM- Peso molecular.

Ram- Ramnose.

R_{Gal}- Distância percorrida pela amostra em estudo/distância percorrida pela galactose.

TFA 1M- Ácido trifluoracético um Molar.

TMS (Me₄Si)- Tetra metil silano.

Ve- Volume de eluição da solução polissacarídica.

Vo- Volume morto da coluna.

Vt- Volume total da coluna.

RESUMO

O polissacarídeo, do exsudato de *Anadenanthera colubrina*, (Angico Branco ou Monjoleiro), foi estudado por metilação, espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. e sua composição em monossacarídeos por g.l.c.-m.s. Este polissacarídeo é constituído por: 64% de arabinose, 20% de galactose, 6% de ramnose e 10% de ácido glucurônico. O ácido aldobiurônico isolado foi identificado como 6-O- β -D-glucopiranosil(urônico)-D-galactose. Os estudos de metilação do polissacarídeo original mostraram a presença de ramnopiranos terminal, unidades de arabinofuranose terminais e internas e unidades de galactopiranoses 3-O e 6-O substituídas. O polissacarídeo original que apresenta um peso molecular de aproximadamente 1×10^6 , foi submetido a duas degradações sequenciadas de Smith, das quais obteve-se uma galactana com apenas 6% de arabinose (polissacarídeo II) e com um peso molecular de 1.4×10^5 .

Uma estrutura semelhante foi obtida, pela hidrólise ácida parcial de duas horas (polissacarídeo B). Esta apresentou um peso molecular de 1.9×10^5 e um conteúdo de 16% de ácido glucurônico, o que a torna bastante diferente da estrutura do polissacarídeo II, que não contém ácido urônico, embora os pesos moleculares sejam tão próximos.

A determinação do peso molecular por gel-permeação indicou que os polissacarídeos produzidos por hidrólise ácida parcial e por degradações de Smith, não sofreram fragmentação nas suas cadeias principais.

ABSTRACT

The polysaccharide from *Anadenanthera colubrina* exudate, was studied by g.l.c.-m.s., methylation and n.m.r. spectroscopy. It contains 64% of arabinose, 20% of galactose, 6% of rhamnose and 10% of glucuronic acid.

An aldobiouronic acid was isolated and was identified as 6-O- β -D-glucopyranosyl(uronic acid)-D-galactose.

The Methylation studies of the original polysaccharide revealed terminal rhamnopyranosyl, terminal and internal arabinofuranosyl units, and 3-O, and 6-O substituted galactopyranosyl units.

The original polysaccharide, having a molecular weight of approximately 1×10^6 , was submitted to two consecutive Smith degradations and the product of second one (Polysaccharide II) was a galactan, with only 6% of arabinose and a molecular weight of 1.9×10^5 .

A similar structure was produced after a two hours' partial hydrolysis (Polysaccharide B) with a molecular weight of 1.9×10^5 . Despite the similarity they do not have the same structure. The latter had 16% of glucuronic acid, whereas in the former it was absent.

Molecular sieve chromatography indicated that the main

chains of the polysaccharides were not cleaved during the Smith degradation or partial hydrolysis.

INTRODUÇÃO

1- Noções gerais sobre as gomas

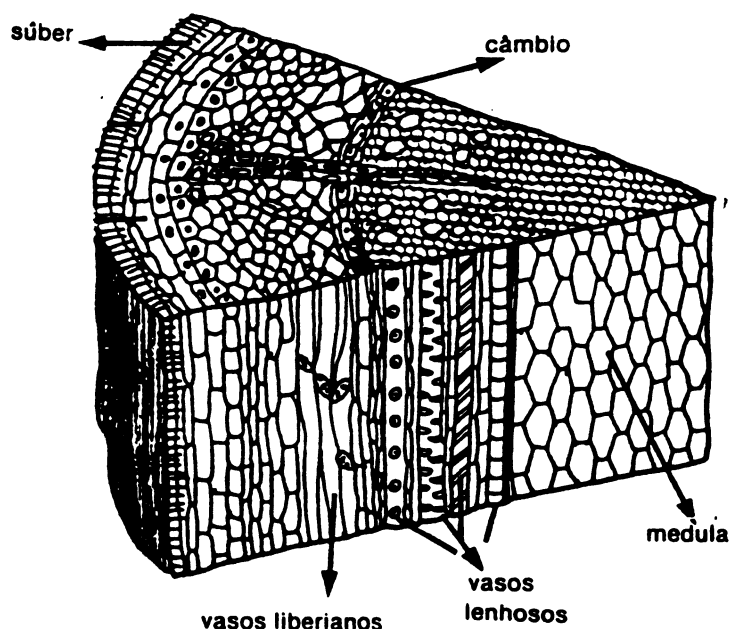
As gomas de exsudatos são aqueles polissacarídeos gomosos produzidos por um grande número de plantas e que são facilmente vistos, principalmente nos troncos das árvores, como massas de cor variável e às vezes secas. Na realidade não são produzidas apenas pelo tronco, mas também por galhos e frutos e surgem provavelmente como um mecanismo de defesa da planta contra lesões, sejam elas mecânicas ou infecciosas. Acácias cultivadas em condições adequadas de solo, temperatura e umidade não produziram goma, enquanto que as mesmas árvores cultivadas em condições desfavoráveis tiveram a secreção promovida. No caso de infecção por microorganismos, a planta produziria a goma para fechar a região infectada e impedir futuras invasões dos tecidos, bem como para prevenir perda de umidade (71, 82, 93).

Marques e Xavier Filho (78) estudaram a goma do cajueiro, determinando, entre outros, suas atividades enzimáticas de enzimas como polifenoloxidase, peroxidase, quitinase, tripsina, quimiotripsina, subtilisina e inibidores da papaína. Detectou-se também a presença de fenóis, que estão relacionados com a defesa da planta. A presença de oxidases e polifenoloxidases está relacionada com processos que estão envolvidos na resposta do

tecido da planta, à infecção. A quitinase também se relaciona com a resposta à agressão por patógenos. Além disso, ataques da planta por inseto ou microorganismos, ou mesmo agressões mecânicas induzem a planta a sintetizar inibidores de proteinases. A presença destes compostos e destas atividades, que se sabe serem produzidas como resultado da ação de indutores, cuja síntese é mediada pela ação de insetos ou patógenos, sugere que a goma do cajueiro é parte de uma defesa bioquímica da planta.

Quanto ao local de formação das gomas, Joseleau e Ullmann (72), estudaram a *Acacia senegal* (goma arábica) e mostraram que esta goma é produzida na região cambial, ou mais precisamente entre a região cambial e a região da casca interna, como mostrado no desenho da página seguinte. Isto foi feito estudando-se a composição dos diversos polissacarídeos produzidos na região da casca interna, na região cambial e nas zonas do xilema de um galho produtor de goma e comparando-se com a composição da goma arábica. A região cambial produtora de goma e a região da casca interna tiveram as composições mais semelhantes à composição da goma arábica. A região do xilema apresentou uma composição completamente diferente. Passou-se então a estudar apenas a região cambial. Isto foi feito por análise de metilação e por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. e os resultados confirmaram os anteriores, ou seja, a goma e o material da região cambial mostraram proporções de

açúcares metilados muito parecidas e espectros de ^{13}C -n.m.r. praticamente idênticos. Concluiu-se então, que na região cambial encontra-se o precursor da goma. Existem dúvidas porém, quanto à formação definitiva do polímero, ou seja, se o polímero é sintetizado por completo no próprio nódulo onde é exsudado, ou se sai pronto do câmbio.



Um outro ponto a ser observado com relação às gomas de uma maneira geral, são as famílias nas quais elas ocorrem. A maior parte dos exsudatos estudados, classifica-se dentro da divisão Angiospermae, porém também são descritos entre Gimnospermae. As principais famílias às quais pertencem os exsudatos são: Anacardiaceae, Bromeliaceae, Burseraceae, Cactaceae, Combretaceae, Coniferaceae, Gnetaceae, Leguminosae, Meliaceae, Umbelliferae, Proteaceae, Rosaceae,

Rutaceae, Sapotaceae e Sterculeaceae. A família onde se tem mais gomas estudadas é a família das Leguminosas, em que se encontra a goma arábica e muitas outras Acacias (30).

Em termos de composição dos exsudatos, ou seja, de características de cada polissacarídeo, parece que os mesmos variam de espécie para espécie, vindo daí um dos motivos pelos quais torna-se importante estudá-los.

As substâncias mais úteis para a quimiotaxonomia são os chamados produtos secundários, tais como exsudatos de gomas, taninos, óleos essenciais, glicosídeos e alcalóides (11).

Parece também que a composição dos exsudatos varia de acordo não somente com a espécie, mas também com o habitat. Foi feito um estudo, com exsudatos do gênero *Acacia* utilizando-se seis amostras da Índia e duas amostras da África (73). As seis *Acacias* da Índia (*Acacia nilotica*) foram coletadas em quatro diferentes locais sendo que a quinta e a sexta amostra foram coletadas no mesmo local que a quarta, mas em diferentes estações do ano. Os resultados obtidos, com relação à rotação específica, composição dos monossacarídeos, viscosidade e espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., mostraram que apenas em alguns parâmetros ocorrem diferenças entre as amostras da Índia e da África, porém estas diferenças são substanciais.

Isto parece dizer, que as diferentes condições climáticas, composição do solo e outros fatores do habitat de cada árvore, resultam em diferentes exsudatos.

No que diz respeito à classificação das gomas de exsudatos, o que se verifica é que diferentes classificações foram propostas no decorrer do tempo.

Assim é que em 1959, Smith e Montgomery (93) classificam as mesmas em termos de propriedades físicas, tais como solubilidade, viscosidade, etc. Como tal classificação não foi satisfatória, outra foi proposta mais tarde, em termos de variações do tipo de ácido urônico, mas como não levava em consideração gomas que eram constituídas apenas por açúcares neutros, também ficou incompleta. Outra classificação surgiu, baseando-se na acidez do polímero. No grupo I ficavam as gomas e mucilagens ácidas (as que continham ácidos urônicos) no grupo II as neutras e no grupo III as básicas.

Anos mais tarde, surge a classificação de Aspinall (21), bem mais complexa que as anteriores, baseando-se nas cadeias internas da molécula. Porém, como não se conhece ainda as estruturas detalhadas de muitos polissacarídeos, não constitui uma classificação perfeita. Aspinall considera as gomas como pertencentes a diversos grupos: (a) O grupo das galactanas, cuja cadeia interna é formada basicamente por unidades de galactose ligadas (1→3) e (1→6), (b) o grupo das glucuronomananas, em que a cadeia principal é constituída de moléculas de ácido glucurônico ligados a unidades de manose, (c) o grupo das galacturonoramnanas, no qual se incluem as gomas que contém cadeias internas formadas por unidades de ácido D-galacturônico e L-ramnose; (d) o grupo das xilanas, no qual as gomas contém

unidades internas de D-xilopirranose e finalmente (e) o grupo das xiloglucanas, que até então abrangia apenas gomas de sementes e não de exsudatos.

Stephen (95) utiliza-se de uma classificação geral dos polissacarídeos em que no grupo IV, estão incluídas as L-arabinanas, D-galactanas e as L-arabino-D-galactanas. As L-arabino-D-galactanas se subclassificam em L-arabino-D-galactanas do tipo I (pécticas) e em L-arabino-D-galactanas do tipo II, ao qual pertencem as galactanas ramificadas, substituídas em O-3 e em O-6. É neste último sub-grupo que estão incluídas as gomas de plantas, pois na sua maioria são arabinogalactanas (que na classificação de Aspinall seria o grupo das galactanas). As gomas de plantas também se enquadram em outras duas divisões maiores dos polissacarídeos: as pectinas e as xilanas. As gomas de *Acacia* que têm sido estudadas, têm sido escolhidas de divisões taxonômicas bem definidas. Aproximadamente um décimo das espécies de *Acacia* foram, ou estão sendo estudadas. O gênero *Acacia* é muito grande (há cerca de 900 espécies de *Acacias*) e ainda apresenta muitos problemas de nomenclatura e classificação. Este gênero foi dividido em seis séries e quinze sub-séries, por Benthams (11). As divisões de Benthams são baseadas no habitat, inflorescência e distribuição geográfica e são: série 1, *Phyllodineae*; série 2, *Botryocephalae*; série 3, *Pulchellae*; série 4, *Gummiferae*; série 5, *Vulgares*; série 6, *Filicinae*. As gomas da série 6 são as nativas da América do

Sul. Veja esta classificação na página 20.

As gomas de cada série e ou subsérie de Benthams, foram estudadas quimicamente e apresentam características em comum, não apenas quanto à cadeia interna mas também quanto às cadeias externas, à rotação específica, o peso molecular e outras características (95). Um exemplo está na página 21.

Desta forma, as gomas cujas características (do ponto de vista químico) são diferentes da maioria, podem ser mudadas de uma série em que estão classificadas, pela classificação de Benthams, para outra mais adequada. A estrutura destas arabinogalactanas de exsudatos, de um modo geral consiste em:

a) uma cadeia principal de unidades de D-galactopiranosose unidas por ligações (1→3) e (1→6) b) unidades de ácido D-glucurônico e ou seu éter 4-metílico em cadeias externas em posições terminais ou não; c) resíduos externos de L-arabinofuranose ou de L-ramnopiranosose (95). Algumas destas arabinogalactanas de Acácias e de outros gêneros serão discutidas a seguir.

2- Arabinogalactanas de Acácias

Acacia robusta

O exsudato de *Acacia robusta* (42) consiste em um polissacarídeo (uma arabinogalactana) que possui várias características que o encaixam junto a outros polissacarídeos de gomas da série 4 de Benthams (11). Entre elas estão: a rotação

específica positiva (+ 36^o), o alto peso molecular (720.000), a alta proporção de arabinose (50%) e a baixa proporção de ácido urônico (9%) e de ramnose (1%).

Consiste em um esqueleto de galactana ramificado (26% de extremidades não redutoras, segundo os dados de metilação), que é constituído por ligações do tipo (1→3) e (1→6). Possui cadeias laterais de arabinofuranose não apenas como grupos terminais, mas também substituídas em O-2 ou O-3, em O-5 ou em O-2 e O-5 ao mesmo tempo. Uma outra característica em comum com a dos outros polissacarídeos da série 4 é a presença do ácido aldobiurônico 4-O-metil-β-D-glucopiranosil(ácido urônico)-D-galactopiranosose, (ligados na posição O-4 ou em O-6 da galactose) bem como da arabinobiose 3-O-β-L-arabinopiranosil-L-arabinose. O ponto de divergência é a porcentagem de proteína mais alta que a dos demais.

O processo degradativo de hidrólise ácida parcial produzido no polissacarídeo de *Acacia robusta*, originou outro polissacarídeo que perdeu as unidades de L-arabinofuranose e L-ramnose e conseqüentemente sofreu aumento do seu percentual de ácido urônico. Os resultados da análise de metilação mostram que o polímero é constituído por unidades de galactopiranosose ligadas (1→6), que antes estavam sendo protegidas por unidades de arabinofuranoses (o derivado 2,3,4-Me₃-Gal que antes existia na proporção de 2,0% passou para 16%). Esta despolimerização é também semelhante às que ocorrem em

outros polissacarídeos da série 4, tais como os de *Acacia arabica* (15), *Acacia drepanolobium* (12), *Acacia nubica* (8) e *Acacia seyal* (9). Todas estas quatro *Acacias* apresentam em comum, além das características já citadas, a presença do aldobiurônico 6-O- β -D-glucopiranosil(ácido urônico)-D-galactose e também do ácido aldobiurônico 4-O- α -D-glucopiranosil(ácido urônico)-D-galactose. Os experimentos para análise de ligações destas quatro gomas mostraram dissacarídeos em comum, além da arabinobiose já citada. São eles: o 3-O- β -D-galacto-piranosil- D-galactose e o 6-O- β -D-galacto-piranosil- D-galactose (8, 9, 12, 15).

O polissacarídeo original do exsudato de *A. robusta* foi estudado após três sucessivas degradações de Smith e aquele que foi hidrolisado parcialmente, foi estudado após sofrer apenas uma degradação de Smith. Com o polissacarídeo resultante da segunda degradação de Smith, ocorreu uma despolimerização bem grande, pois seu peso caiu de 330.000 para apenas 3.000, efeito também comparável ao de outros polissacarídeos pertencentes à série 4, tais como o de *Acacia arabica* (15), *A. drepanolobium* (12) e *A. seyal* (9). Outra característica comum a estes polissacarídeos é a queda da rotação específica do polissacarídeo da primeira oxidação, em relação ao original. Através dos pesos moleculares do polissacarídeo da segunda oxidação, que caiu de 3.000 para apenas 700 na terceira, dos dados do consumo de periodato e comparando-se com outras *Acacias* estudadas, postulou-se que a

sua cadeia principal fosse constituída de unidades de galactoses ligadas (1→3), surgindo uma ligação (1→6) a cada 4 unidades.

Acacia erioloba

A *Acacia erioloba*, da série 4 de Bentham é diferente de outras *Acacias* da mesma série. Tem um teor alto de proteína (53-56%), característica da série 1 (subsérie Juliflorae), cujas gomas têm conteúdo elevado de proteína (40-53%), rotação específica negativa e alta proporção de 4MeGlcA (9 a 33% do total de carboidrato). O espectro de ^1H -n.m.r. de *A. erioloba* além dos sinais de δ 4.4 - δ 5.2 dos prótons anoméricos apresentou o sinal de δ 3.48 (OMe). Os ácidos aldobiurônicos isolados deste exsudato foram: $[\alpha\text{-4MeGlcA-(1}\rightarrow\text{4)-Gal}]$ e o $[\beta\text{-4MeGlcA-(1}\rightarrow\text{6)-Gal}]$, cujas estruturas foram confirmadas não só pelo espectro de próton, como também pelos dados de metilação (apareceu o derivado 2,3,4,6-Me₄-Glc decorrente da metilação do polissacarídeo com sua carboxila reduzida), mostrando que existe uma proporção de 4MeGlcA, nesta goma.

Enfim, os resultados obtidos com o exsudato de *Acacia erioloba* indicam que: pouco polissacarídeo está presente. O carboidrato está distribuído na glicoproteína na forma de substituintes na hidroxiprolina (Hyp). Todo o ácido urônico (que está na forma de 4MeGlcA), ocorre como grupos terminais não redutores, como também a manose (que existe em pequena proporção), a maioria das unidades de

arabinose e algumas unidades de galactose. A glicosilação das unidades de Hyp é feita por monossacarídeos ou pequenos oligossacarídeos. Os oligossacarídeos são predominantemente lineares, mas há alguma ramificação. A ligação do ácido urônico se faz principalmente nas posições 4 ou 6 das unidades de galactopirranose. Nenhuma das unidades de arabinofuranose está substituindo as unidades de galactose, parece porém, que algumas unidades de Gal estão ligadas à arabinofuranose nas cadeias laterais de oligossacarídeos (48).

Este polissacarídeo por ter uma estrutura tão diferente dos demais (das gomas da série 4), poderá ser transferido para outra série da classificação de Bentham .

Acacia senegal

A *Acacia senegal* (goma arábica) provavelmente por causa da sua importância comercial, foi bastante estudada. Desde 1939, quando foi estudada por Smith (92) até a década de 90, surgiram diversos trabalhos, com relação à sua estrutura e também com relação a outras características (16, 17, 35, 44, 81).

Em 1939, o trabalho de Smith mostrou que o ácido arábico obtido da goma arábica, se sofresse hidrólise ácida parcial, ou autohidrólise forneceria o "ácido arábico degradado", constituído por unidades repetitivas de nove unidades de galactopirranose para 3 unidades de ácido glucurônico. A este núcleo básico se encontram ligados açúcares unidos

por ligações glicosídicas lábeis, que são removidos por hidrólise ácida parcial. O ácido arábico foi estudado por metilação e apresentou os derivados: 2,3,4,6-Me₄-Gal, 2,3,4-Me₃-Gal, 2,4-Me₂-Gal e 2,3,4-Me₃-GlcA, mostrando que no ácido arábico estão presentes ligações glicosídicas do tipo (1→3) e (1→6) (92).

Mais tarde, Anderson, Hirst e Stoddart (16) estudaram os ácidos urônicos da goma arábica, utilizando a cromatografia de peneira molecular. A goma (que no seu estado original é composta por: arabinose 25%, galactose 34%, ácido urônico 17%, ramnose 12% e umidade 11%) mostrou-se após sofrer autohidrólise, ser composta de 2% de arabinose, 68% de galactose, 19.2% de ácido urônico e 9,7% de umidade. A investigação por peneira molecular levou à conclusão que a goma apresenta uma heterogeneidade do tipo heteropolimolecular (que descreve sistema de polímeros que apresentam uma variação na composição dos monômeros e ou uma variação no tipo de ligação e ramificação das unidades, bem como uma distribuição do peso molecular). As técnicas cromatográficas revelaram a presença do ácido aldobiurônico 6-O-[4-O-metil-β-D-glucopiranosil(ácido urônico)]-D-galactose, além do já conhecido ácido 6-O-β-D-glucopiranosil(ácido urônico)-D-galactose. No ano seguinte novos estudos com *A. senegal* (17), através de sete degradações sucessivas de Smith, estudando-se os diferentes derivados metilados dos cinco primeiros polissacarídeos, revelam novas características

estruturais. Algumas estruturas foram propostas para o polissacarídeo da quinta degradação de Smith (resistente ao periodato). Em uma delas se mostra uma estrutura de unidades de galactose β (1 $\rightarrow$ 3) ligadas, ramificada randomicamente com pontos de ramificação β (1 $\rightarrow$ 6). Em outra, a cadeia principal de β (1 $\rightarrow$ 3) poderia ter ligações (1 $\rightarrow$ 6) alternativamente.

Mais recentemente mostrou-se que a goma arábica contém uma cadeia principal de galactana (1 $\rightarrow$ 3) com algumas ligações (1 $\rightarrow$ 6) alternadas. Cadeias laterais neutras de oligossacarídeos de galactopiranosose (1 $\rightarrow$ 6) e de oligossacarídeos de arabinopiranosose ou arabinofuranose ligados (1 $\rightarrow$ 3), estão localizados na posição 3 do core. Cadeias laterais como α -L-ranopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopiranosil(ácido urônico) ou grupos ácidos como o ácido 4-O-metil- β -D-glucopiranosilurônico, estão localizados na posição 6 da cadeia principal (44).

A *A. senegal*, na classificação de Bentham, pertence à série 5, subsérie 1 (11).

O estudo através de espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., mostra que as unidades de arabinofuranose ocorrem em posições internas e externas, ou seja, localizadas mais próximas ou mais distantes da cadeia principal e que o ácido glucurônico pode estar ligado à arabinofuranose e não exclusivamente à galactose como se pensava. Os sinais que apareceram foram bastante definidos e a confirmação destes sinais, foi obtida pela correlação da modificação destes sinais depois de hidrólise ácida controlada.

Uma degradação de Smith, feita após uma hidrólise ácida parcial, levou a um polissacarídeo que apresentou no seu espectro apenas seis sinais, atribuídos aos carbonos 1 a 6 da β -galactana ligada (1 $\rightarrow$ 3) (44).

Acacia campylacantha

O polissacarídeo que esta árvore exsuda, e que pertence à mesma série que *A. senegal* (série 5), contém 54% de D-galactose, 29% de L-arabinose, 8% de L-ramnose, 7% de ácido glucurônico e 2% de ácido 4-O-metil-D-glucurônico (18). Estudos de metilação, degradação de Smith e outros mostraram que a goma desta *Acacia* é fortemente relacionada às de *A. senegal* e *A. laeta* (10).

Acácias das séries Gummiferae e Vulgares

Anderson e Farquhar (13) estudando oito *Acácias* que ainda não haviam sido estudadas (*A. hebeclada*, *A. kirkii*, *A. newbrownii*, *A. reficiens* da série Gummiferae e *A. erubescens*, *A. fleckii*, *A. mellifera* e *A. detinens* da série Vulgares) revelam a existência de mais algumas gomas não usuais como as de *A. erubescens* e *A. fleckii* contendo glucose (12 % e 3 % respectivamente), confirmada por testes específicos com glucose oxidase e *A. hebeclada* com um alto conteúdo de nitrogênio (59% de proteína).

Acacia xanthopholea

O polissacarídeo de *Acacia xanthopholea* tem um peso molecular de 860.000 e é constituído de: 57% de Gal, 22% de Ara, 6% de Rha, 8,8% de GlcA e 6.2% de 4MeGlcA. Os polissacarídeos original e degradados deste exsudato foram minuciosamente estudados, por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. Os resultados foram semelhantes aos observados com *A. senegal* (44), descrita antes. Foram feitos estudos de degradação de Smith (3 sucessivas) no polissacarídeo original e também no polissacarídeo degradado (uma). A goma hidrolisada parcialmente e depois oxidada é praticamente uma galactana residual. O polissacarídeo da segunda degradação de Smith indica uma estrutura que consiste numa cadeia principal de unidades de β galactose ligadas (1 $\rightarrow$ 3), com algumas substituições em O-6 como foi também demonstrado por métodos químicos. O polissacarídeo da terceira degradação de Smith apresenta uma estrutura muito parecida com a da goma primeiro hidrolisada parcialmente e depois oxidada - ambas são cadeias de galactopiranoses ligadas (1 $\rightarrow$ 3). As unidades de arabinose substituídas em O-3 no polissacarídeo original são evidenciadas pelo isolamento do dissacarídeo 3-O- β -D-galactopiranosil-L-arabinose e também do 3-O- β -L-arabinofuranosil-L-arabinose. A *A.xanthophloeae* tem pois, uma goma bastante parecida à da goma arábica, embora as proporções sejam um pouco diferentes, como ocorre de uma maneira geral nas *Acacias* (83).

Acacia saligna

Esta goma tem uma arabinogalactana composta pelas mesmas unidades monossacarídicas que as demais *Acacias* descritas, porém a proporção de ramnose para a de ácido urônico é de aproximadamente 1 (38). Este fato, ocorre também em outras *Acacias* como por exemplo a *Acacia mearnsii* que apresenta galactose, arabinose, ramnose e ácido urônico nas seguintes proporções: 5.6: 4.9: 1.0: 1.6 (24) e a *Acacia senegal* que apresenta uma proporção de ácido urônico/ramnose de 1.4: 1 (16).

Com base nestes valores postulou-se que a ramnose pudesse estar ligada ao ácido urônico, nestas três gomas. Também já havia sido proposto na goma arábica, oligossacarídeos de ramnose ligados (1→4) ao ácido urônico (44). Com a intenção de provar que na goma de *Acacia saligna*, toda a ramnose está ligada ao ácido urônico. Charlson et al. (38), estudaram o polissacarídeo desta goma, após sofrer redução do grupamento carboxílico do ácido urônico, por diborano e depois sofrer acetólise. Além de vários outros oligossacarídeos, encontraram um dissacarídeo composto por ramnose e glucose, como se esperava. Os resultados da oxidação por periodato e da metilação indicaram a união destes dissacarídeos por ligação glicosídica (1→4). A técnica de ^{13}C -n.m.r., aliada à ^1H -n.m.r., bem como a espectros de técnicas como COSY (correlated spectroscopy) e outras, comprovaram que o dissacarídeo isolado era de fato, o

4-O- α -L-ramnopiranosil-D-glucose. Obtidos estes resultados, surgiu uma hipótese quanto à biossíntese das gomas de *Acacias*. Mais especificamente sobre a ramnose - de que esta possa ser transferida de um nucleotídeo-difosfato-ramnose bacteriano para o polissacarídeo da planta através de uma glicosil transferase bacteriana. Isto porque o dissacarídeo citado existe num grande número de polissacarídeos bacterianos (38).

A. saligna pertence à subsérie 6, da série 1 de Bentham, porém apresenta características diferentes de outras gomas desta série. *Acacia longifolia* (subsérie 8) é muito semelhante à *Acacia saligna* e existem evidências para transferir esta última para a subsérie 8 (95).

Outras *Acacias* da série 1 (Phyllodineae)

Várias *Acacias* da série 1, como *A. difformis*, *A. mabellae* (40), *A. retinoides* e *A. rubida* foram estudadas e comparadas com duas outras desta série - *A. pycnantha* e *A. podalyriifolia*. Apresentaram como características o ácido aldobiurônico 6-O- β -D-glucopiranosil(ácido urônico)-D-galactose, como único constituinte e apenas traços do derivado 4-O-metil, de forma semelhante às duas previamente estudadas. Os exsudatos estudados foram considerados muito semelhantes aos de *A. pycnantha* [que apresenta uma cadeia principal de galactoses (1 $\rightarrow$ 3) e cadeias laterais ligadas ao O-6] (63) e de *A. podalyriifolia*, analítica e estruturalmente. As gomas da série 1 (exceto por *A.*

cyanophylla), são muito diferentes daquelas da série 4 e da série 5 (4). Outras espécies da série 1, foram estudadas por Anderson e Gill (14), mais especificamente da subsérie Juliflorae - *A. holosericea*, *A. mangium*, *A. pubifolia* e *A. leptostachia*. Estas gomas parecem ser mais proteináceas, mais acidicas e mais viscosas, com um conteúdo de metoxil maior, pesos moleculares mais altos e proporções menores de ramnose e arabinose, que a maioria das *Acacias* da série estudadas até então. Uma outra *Acacia* desta série - *A. mabellae*, é produtora do polissacarídeo, que tem a mais alta uniformidade de estrutura molecular dentre esta série (40).

Acacia bayleana

O polissacarídeo do exsudato desta *Acacia* se assemelha em alguns pontos com *A. podalyriaefolia* e *A. elata*, das séries 1 e 2 respectivamente, na composição e proporção dos monossacarídeos e no padrão de clivagem do polissacarídeo (41).

Acacias da série 2 (Botryocephalae)

A série Botryocephalae, tem exsudatos gomosos de ao menos dois tipos quimicamente distintos, segundo Anderson et al. (7). O grupo A tem baixa relação Gal/Ara (<2:1), rotações específicas fortemente negativas, alta viscosidade intrínseca e

alto peso molecular, conteúdos relativamente altos de nitrogênio e ramnose. O grupo B, relação Gal/Ara alta ($>4:1$), rotações ópticas fracamente negativas ou positivas e conteúdo de grupo metoxil, nitrogênio, anidrido urônico e ramnose baixo (*A. filicifolia*, *A. leucoclada* e *A. terminalis*) (7, 39).

Acacia macracantha

A goma desta espécie, que nunca foi estudada antes, incluída na série 4 de Benthams, apresenta algumas características atípicas para uma *Acacia* desta série. Foram estudadas 8 amostras coletadas em diferentes locais na Venezuela e estas apresentaram semelhanças. Algumas das suas características são: ácido urônico de 18 a 26%, conteúdo de ramnose de 1 a 5 %, e a relação da galactose para a arabinose variando de 0.8 a 1.7 (valor médio das oito amostras, sendo que apenas duas apresentaram valor < 1). Apresentam rotação específica negativa, (-6° a -8°), viscosidade intrínseca de 10.1 a 15.5 ml/ g, sendo que a rotação específica negativa e a relação Gal/Ara > 1 , são as características atípicas para esta série (79).

A classificação de Benthams com alguns exemplos de *Acacias* pertencentes a algumas das séries e subséries desta classificação, são mostradas na tabela que segue (pg.20).

Série	espécies de <i>Acacia</i>
Série 1- Phyllodineae	*Obs.: os números entre parênteses indicam o n.º de espécies para cada série e subsérie. <i>A.cyanophylla</i>, <i>A.penninerves</i> <i>A.podalyriifolia</i>, <i>A.pycnantha</i> <i>A.microbotrya</i> <i>A.harpophylla</i>
Sub-séries 1. Alatae (5)*	
2. Continuae (5)	
3. Pungentes (35)	
4. Calamiformes (18)	
5. Brunioideae (8)	
6. Uninerves (92)	
7. Plurinerves (48)	
8. Juliflorae (66)	<i>A. dealbata</i>, <i>A. elata</i> <i>A. mearnsii</i>, <i>A. decurrens</i>
Série 2- Botryocephalae (10)	
Série 3- Pulchellae (8)	
Série 4- Gummiferae (60)	<i>A.giraffae</i>, <i>A.farnesiana</i>, <i>A.arabica</i>, <i>A.drepanolobium</i>, <i>A.fistula</i>, <i>A.karoo</i>, <i>A.seyal</i>, <i>A.nilotica</i>, <i>A.nubica</i>
Sub-séries 1. Summibracteatae (13)	
2. Medibracteatae (39)	
3. Basibracteatae (8)	<i>A.senegal</i>, <i>A.campylacantha</i>, <i>A.laeta</i>, <i>A.melliifera</i>,
Série 5- Vulgares (75)	
Sub-séries 1. Gerontogaeae spiciflorae (25)	
2. Americanae spiciflorae (19)	
3. Americanae capitulatae (26)	
4. Gerontogaeae capitulatae (5)	
Série 6- Filicinae (2)	

Outra tabela, mostra as propriedades das séries 4 e 5:

Propriedades	Série 4	Série 5
Rotação específica	positiva	negativa
Relação ram/ ácido ur.	>1	1
Ácido aldobiurônico	6-O-(β -D-AG)-D-Gal 6-O-(4-Me- β -D-AG)-D-Gal 4-O-(α -D-AG)-D-Gal 4-O-(4-Me- α -D-AG)-D-Gal	6-O-(β -D-AG)-D-Gal 6-O-(4Me- β -D-AG)-G
Dissacarídeos neutros (hidr. ácida parcial)	3-O- β -D-Galp-D-Gal 6-O- β -D-Galp-D-Gal 3-O- β -L-Araf-L-Ara 3-O- β -L-Arap-L-Ara	3-O- β -D-Galp-D-Gal 6-O- β -D-Galp-D-Gal 3-O- β -L-Araf-L-Ara 3-O- β -L-Arap-L-Ara 3-O- α -D-Galp-L-Ara
O-Metil-L-Arabin. (gomas metiladas)	2,3,5 e 2,3,4-tri, 2, 3,5 e 3,4-di-O-metil-L- arabinose.	2,3,5- e 2,3,4-tri e 2,5,-di-O-metil- L-arabinose.
Comprimentos das cadeias laterais de arabinose	algumas chegam a 6 uni. nenhuma termina em Gal.	mais longa-5 uni. algumas terminam em unidad. de Gal.
Mudanças na rotações específica nas degr. sequenc. de Smith.	A rot. específica cai	A rotação especif. sobe
Bases da estrutura molecular	Blocos de D-galactoses β -1,3 ligadas,intercal. por blocos de galactose β -1,6 ligadas.Ramific.	estrutura ramific. com galactoses 1,3 ligadas.
Peso molecular médio	≥850.000	≤ 600.000

* *Acacia nubica* não dá o derivado 3,4-di-O-metil-L-arabinose.

Fonte bibliográfica das duas tabelas: ref. 11.

3- Arabinogalactanas de outros gêneros

Spondias pinnata

O exsudato produzido por esta árvore é também como nas Acacias, uma arabinogalactana, constituído de 47% de D-galactose, 23% de L-arabinose e de 30% de ácido galacturônico (e não glucurônico como visto em todas as Acacias descritas). Os estudos de metilação do polissacarídeo original e do polissacarídeo degradado (que sofreu hidrólise parcial) antes e depois da redução da carboxila do ácido urônico e os estudos de degradação de Smith levaram a uma cadeia principal de galactana (1→3), sendo que com apenas uma degradação de Smith, se chegou a essa cadeia principal e a mesma não permitiu uma secunda degradação de Smith, sendo provavelmente constituído de galactoses ligadas (1→3) somente. A presença do ácido galacturônico foi comprovada, pelos dados de metilação - pela presença dos derivados 2,3,4-Me₃-Gal e 2,3-Me₂-Gal, na goma original e degradada, após a redução da carboxila. O derivado 2,3, mostra que o mesmo está envolvido nas ligações (1→4) é o 2,3,4 que ele funciona como extremidade não redutora (50).

Encephalartos friderici guilielmi

Esta planta produz uma mucilagem ácida, cujo estudo por

espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., revelou ser constituída por uma cadeia principal de galactana β -(1 $\rightarrow$ 3), como todos os outros exsudatos aqui descritos. Foi feita uma separação do polissacarídeo, em A e B, através de gel-permeação. A fração B foi então estudada. A presença de arabinofuranose, indicada por estudos de metilação foi confirmada pelos sinais de δ 110.1 (C-1), o ácido urônico por um sinal em δ 175.5 (C-6); a ramnopirranose pelos sinais de δ 101.5 (C-1) e de δ 17.4 (C-6), e a galactopirranose 6-O substituída, pelo sinal de CH_2 deslocado para δ 70.6, por causa da glicosilação. Os produtos de auto-hidrólise de B, mostraram que (depois de 16 h), todas as unidades terminais de arabinofuranose haviam desaparecido e que os sinais (δ) específicos das unidades de ramnopirranose terminais haviam diminuído em intensidade. Como o decréscimo dos sinais da ramnose ocorreu juntamente com o do sinal atribuído ao C-4 do ácido urônico, deduziu-se desta forma, a ligação da ramnose por (1 $\rightarrow$ 4) ao ácido urônico. A presença da galactopirranose (1 $\rightarrow$ 3) ligada, na cadeia principal foi evidenciada pelo sinal em δ 82.8. O polissacarídeo que sofreu degradação de Smith apresentou sinais que confirmam a estrutura sugerida (3).

Boswellia serrata

Na arabinogalactana deste exsudato (90) purificado por gel permeação, o componente homogêneo (eletroforeticamente),

apresentou um alto teor de ácido urônico - 18.2% no polissacarídeo nativo e 20.4% no que sofreu hidrólise moderada. O sinal de δ 176.5 do espectro de ^{13}C - n.m.r. e também o de δ 175.2 confirmaram a presença do ácido glucurônico, nos dois polissacarídeos. O sinal de δ 103.7 pôde ser atribuído ao C-1 do derivado 4-O-metil, cujo grupo metil ressonou em δ 60.74. O C-1 de arabinofuranose se representou pelos sinais de δ 109.9 e δ 108.3, correspondentes a unidades terminais e internas respectivamente e que desapareceram do polissacarídeo hidrolisado suavemente. Sinais em campo baixo, como δ 68.9 e δ 70.0, δ 61.7 e δ 82.8 se referiam a C-6 substituído da galactose, não substituído e ao C-3 da cadeia principal de galactana respectivamente, sugerindo alta proporção de ramos de galactana ligada (1 $\rightarrow$ 6). Após hidrólise ácida parcial, ocorre o desaparecimento das arabinofuranoses e um aumento da proporção de ácido 4-O-metil-D-glucurônico, mostrando que estes estavam ligados exclusivamente às galactoses. Traços de ramnose foram sugeridos por um sinal em δ 17.3.

Anacardium occidentale

Em 1955, surgiu um trabalho com exsudatos nacionais (84), que analisou os hidrolisados da goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale*), entre outras. Identificou-se precariamente arabinose, galactose e ramnose, por cromatografia em papel.

Em 1970, Bose e Momota (36) estudaram-no, no sentido de conhecer sobre sua homogeneidade e ter informações sobre seus monossacarídeos. Também quiseram conhecer seu comportamento nas condições de hidrólise. Fizeram estudos através de reações com diferentes antisoros. Chegou-se aos monossacarídeos (galactose/arabinose 17:1) já citados e também ao ácido galacturônico. Usando-se de diversas técnicas como metilação, hidrólises controladas e outras identificou-se um ácido aldobiurônico, como 6-O- β -D-galactopiranosil(ácido urônico)-D-galactose.

Mais tarde, Anderson et al. (6), afirmam não existir o ácido galacturônico, no polissacarídeo. Entretanto glucose foi evidenciada, pela primeira vez num exsudato de planta. A composição encontrada foi então de 1.9% para ácido 4-O-metilglucurônico, 4.3% para ácido glucurônico, 61% de galactose, 14% de arabinose, 7% de ramnose, 2% de xilose, 2% de manose e 8% de glucose (o material metilado forneceu quantidades isoláveis de 2,3,4,6-Me₄-Glc). Outra característica enfocada neste exsudato foi a presença de auto-agregação de amostras liofilizadas, dando um peso molecular alto depois de alguns dias de estoque (bem maior que o encontrado com a goma fresca), como acontece com muitas Acácias. E aumentando ainda mais até um período de dois meses, com o peso molecular determinado por light scattering, indo neste período, de 1.53×10^5 para até 5.0×10^5 .

Como o exsudato do cajueiro se tornou, de considerável interesse industrial, um novo trabalho prosseguiu no sentido de

posicionar a glucose no polímero (5). O exsudato, foi novamente estudado para homogeneidade, por diversos métodos e estabeleceu-se que trata-se de um sistema homogêneo, de fato. Todas as informações obtidas neste estudo que foi minucioso, empregando todas as técnicas comuns à química de carboidratos, indicaram uma estrutura altamente ramificada da qual faz parte uma cadeia principal de galactose com ligações (1→3) e (1→6) intercaladas. Estas cadeias de galactose acabam em unidades de ramnose, glucose, arabinose, pequenas cadeias de arabinose, de não mais que cinco unidades e mesmo de galactose.

Outras arabinogalactanas

Além das gomas de *Acacia* e das descritas acima, existem muitas outras constituídas por arabinogalactanas. Entre elas as já conhecidas como a goma tragacanta (22), que contém a arabinose como açúcar predominante e apenas traços de ácidos hexurônicos, a goma de *Khaya senegalensis* (seu componente menor) (29), de *Citrus limonia*, o limoeiro (98), *Araucaria bidwillii* (25), cujos polissacarídeos têm uma estrutura interior altamente ramificada e também a Goma "Cholla" (*Opuntia fulgida*) (80) que contém ácido galacturônico em posições terminais nas cadeias externas.

Merece destaque um trabalho recente, feito por Anderson, Weiping e Lewis (19), com Leguminosas de origem americana.

Neste trabalho, oito Leguminosas da América (Guatemala, El Salvador, México e outros), foram estudadas por Anderson et al. São sete as espécies produtoras de exsudatos, as quais foram estudadas: *Cassia grandis*, *Caesalpinia eriostachys*, *Caesalpinia sp nov.*, *Cercidium paraecox*, *Lysiloma acapulcense*, *Senna nicaraguensis* e *Enterolobium cyclocarpum*. Foram estudadas com interesse taxonômico. Todas apresentam na sua estrutura galactose e arabinose, algumas apresentam xilose, outras ramnose. Todas contêm ácido urônico - três delas galacturônico em alta proporção, as outras quatro glucurônico e 4-O-metil glucurônico.

4- Exsudatos que não são arabinogalactanas

Virgilia oroboides

A goma de *Virgilia oroboides* foi exhaustivamente estudada (96), (97), por Stephen. A goma degradada (livre de arabinoses e outros monosacarídeos que ocorrem em traços, como a xilose e talvez ramnose), apresenta em sua estrutura o aldobiurônico de manose típico da classe das glucuronomananas de Aspinall (21): O 2-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil(ácido urônico)]-D-manose. [A este grupo pertence também o exsudato de *Anogeissus leiocarpum* (23)]. Este ácido aldobiurônico estaria nas cadeias mais internas, porém as unidades não estariam ligadas entre si, mas à galactose. As características fundamentais desta goma,

são as unidades de D-galactopirranose unidas entre si por ligações (1→6). Obteve-se também o aldobiurônico 6-O-β-D-glucopeiranosil(ácido urônico)-D-galactose, estabelecendo assim o tipo de ligação do ácido urônico com a galactose e a manose. Parece que existe também traços do derivado 6-O-[4-O-metil-β-D-glucopeiranosil(ácido urônico)]-D-galactose. As cadeias laterais do polissacarídeo da goma de *Virgilia oroboides* fornecem por hidrólise ácida parcial traços de diferentes oligossacarídeos de arabinose e outros oligossacarídeos mostrando uma complexa organização na estrutura periférica (21).

Gomas de Khaya

As gomas de *Khaya*, segundo Aspinall (21) têm cadeias internas formadas por unidades de ácido D-galacturônico e L-ramnose, pertencendo ao grupo das galactouronoramnanas. Nas cadeias externas ocorrem diferentes arranjos de açúcares e possivelmente unidades de D-galactopirranose. Esta classe de gomas se subdivide em três subclasses distintas - a) aquelas em que as cadeias internas são constituídas quase que exclusivamente por unidades de ácido D-galacturônico, b) aquelas em que as cadeias internas contém blocos de ácido D-galacturônico, interrompido por regiões onde tanto o ácido D-galacturônico como a ramnose aparecem, que é o caso de *Khaya grandifoliola* (26) e c) aquelas em que as cadeias internas são

formadas por estes dois açúcares alternadamente. Estes três grupos também se diferenciam através das cadeias externas.

Khaya ivorensis

Esta goma foi reestudada, mais recentemente, por Aspinall et al. utilizando-se de técnicas como a espectrometria de massa e a espectroscopia de ^1H -n.m.r., para determinar a estrutura de oligossacarídeos (27). A porção principal do polissacarídeo foi descrita como sendo construída por uma cadeia principal de ácidos α -D-galacturônicos ligados (1 $\rightarrow$ 4), alternando com unidades de α -L-ramnopiranosose ligadas (1 $\rightarrow$ 2), com cadeias laterais de β -D-galactopiranososes ou ácido 4-O-[(4-O-metil- α -D-glucopiranosil(ácido urônico)]- β -D-galactose ligados com o O-4 das unidades de ramnose.

5- Algumas propriedades industriais das gomas

Segundo Whistler (102) a importância das gomas se deve à capacidade que têm de conferirem às suas soluções ou dispersões aquosas, viscosidade e outras propriedades físicas muito vantajosas do ponto de vista industrial. Estas propriedades físicas se devem à estrutura química do polissacarídeo da goma e à sua forma (daí a importância de se estudar as suas estruturas químicas) - isto porque numa solução ou dispersão ocorrem interações entre o solvente e

o material dissolvido ou suspenso (a goma). Estas interações intermoleculares podem ocorrer entre duas moléculas da goma, entre as moléculas da goma e as moléculas do solvente, ou mesmo entre a goma e outros materiais porventura presentes na solução ou dispersão; também pode ocorrer interações entre diferentes partes da mesma molécula da goma. Considera-se que boas explicações físico químicas podem ser dadas para o comportamento de moléculas ideais, o que não é o caso das gomas, que geralmente apresentam uma distribuição de peso molecular e até mesmo podem apresentar diferentes tipos de moléculas. Então não se pode afirmar qual a estrutura específica que produz uma determinada propriedade física.

As gomas naturais, incluindo goma arábica, goma karaia, e goma tragacanta (31) são utilizadas há muitos anos e ainda encontram muitas aplicações - em alimentos, cosméticos, indústria farmacêutica (62), cerâmica e outros.

As gomas naturais, são importantes na indústria de alimentos, que por sua vez, exige destes produtos utilizados ausência de cor, odor e sabor, poder emulsificante, estabilizante, propriedades espumantes e habilidade para reter umidade. O uso maior das resinas solúveis em água com alimentos é como estabilizantes de sorvetes e leite achocolatado. São utilizadas também para reconstituir alimentos desidratados, estabilizar frutas durante congelamento e descongelamento e outros (102).

Berger e Lester (31) afirmam que os cosméticos seriam o quinto maior consumidor de gomas naturais e resinas hidrossolúveis, que funcionam, neste caso, como ingredientes em cremes de mãos, loções para bebês e cremes depilatórios.

Segundo Sanford e Baird (85) os usos da goma ghatti estão relacionados com suas propriedades emulsificantes e estabilizantes. A goma karaia é utilizada principalmente na indústria farmacêutica. A goma tragacanta, encontrada nas regiões montanhosas do Irã, Síria e Turquia, tem a sua utilização dependente de alta viscosidade a baixas concentrações, estabilidade a calor e acidez, propriedades emulsificantes efetivas e bom tempo de vida de prateleira.

Estas gomas de exsudatos mais utilizadas na indústria vêm sendo objeto de estudos, no sentido de melhorar as suas qualidades industriais. Assim é que Bokhary et al. (35) investiga os efeitos da irradiação gama de uma fonte de Co^{60} na determinação da deterioração de microorganismos crescendo na goma arábica e na sua composição de carboidratos. Isto porque se um meio seguro de irradiação puder ser usado para a erradicação dos microorganismos que crescem na goma, de modo que a composição química não seja alterada, a goma pode ser usada industrialmente sem o receio de que haja o crescimento dos mesmos. Os resultados obtidos foram bons. A constituição química da goma praticamente não se alterou, incluindo galactose, arabinose, ramnose e ácido urônico - a quantidade e a qualidade destes açúcares foi afetada insignificamente

pelas várias doses de irradiação usadas. Este resultado é extremamente importante, concluiu-se, pois significa que a goma pode ser irradiada para erradicar a microflora associada a ela e então usada para propósitos industriais, sem ser quimicamente afetada.

Pazur et al., (81) isolou duas séries de anticorpos de coelhos dirigidos contra diferentes unidades estruturais da goma arábica. A antigenicidade da goma arábica para anticorpos contra pneumococos já era conhecida e a estimulação dos imunócitos para sintetizar anticorpos contra a goma arábica bem como a detecção destes anticorpos, também. As duas séries de anticorpos isolados foram separados do soro imune pela técnica da cromatografia de afinidade. Os membros da série um são dirigidos contra unidades de ácido glucurônico-galactose e os da série dois, contra unidades de ácido glucurônico-arabinofuranose. Os anticorpos anti-goma arábica poderiam funcionar como reagentes analíticos na detecção das alterações da goma arábica em produtos comerciais, o que é também uma contribuição para a melhoria da qualidade das gomas utilizadas industrialmente.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é caracterizar parcialmente a estrutura química do polissacarídeo extraído do exsudato de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco ou Monjoleiro), considerando a relevância que este estudo possa ter na quimiotaxonomia de plantas da família Leguminosea, bem como o subsídio que possa dar para estudos de aplicações industriais e talvez até medicinais deste e de outros exsudatos produzidos por árvores existentes no Brasil.

Para tanto, planejou-se executar os seguintes procedimentos:

A- Estudo estrutural do polissacarídeo, chamado original, que não sofreu nenhum tratamento químico, por técnicas como análise de metilação e espectroscopia de ^{13}C -n.m.r e de ^1H -n.m.r. bem como dos seus monossacarídeos constituintes, por g.l.c.-m.s..

B- Isolamento e identificação de um ácido aldobiurônico, liberado deste polissacarídeo, por n.m.r..

C- Análise de dois polissacarídeos derivados do original (A e B) por hidrólises ácidas parciais de uma e duas horas, por n.m.r. e também a sua composição em monossacarídeos, por g.l.c.-m.s..

D- Análise de dois outros polissacarídeos (I e II),

obtidos do original, após uma e duas degradações de Smith respectivamente, e de seus monossacarídeos, pelas mesmas técnicas.

E- Determinação do peso molecular aproximado dos cinco polissacarídeos, utilizando gel permeação.

F- Comparar o polissacarídeo em estudo, com outros polissacarídeos estudados e classificados, de modo a direcionar para uma possível classificação futura, quando a estrutura estiver melhor elucidada.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1- Métodos analíticos gerais

1.1- As medidas de pH que exigiram pouco rigor foram feitas com papel indicador da Merck e as de maior precisão, bem como os ajustes de soluções, foram feitas em aparelho CLAMANN & GRAHNERT MV 85 (Dresden).

1.2- As liofilizações de polissacarídeos e outros, foram feitas em aparelho VIRTIS, modelo 10-145 MR-BA (66).

1.3- Evaporações com a finalidade de concentrar soluções foram feitas em evaporador rotatório, a vácuo, FISATOM 803, em banho de água (65), com temperaturas geralmente inferiores a 40°C.

1.4- Dosagens por colorimetria

As determinações espectrofotométricas foram feitas em aparelho Coleman Junior, modelo 6 A e em aparelho Micronal B 380, na região do visível.

1.4.1- A determinação quantitativa de proteínas foi feita pelo método de LOWRY et al. (53, 76), usando o reagente de Folin & Ciocalteu. A intensidade da cor azul do óxido de molibdênio, produzida a partir da redução das hidroxilas fenólicas das tirosinas, pelos sais de fosfomolibdato (do reativo de Folin Ciocalteu), foi medida a 660 nm.

1.4.2 - Os carboidratos totais foram dosados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (45, 75), no qual o hidroximetilfurfural e o furfural conjugam-se com o fenol, dando um complexo colorido. As leituras foram feitas a 490 nm, usando-se como padrão a D-galactose.

1.4.3 - O ácido urônico dos diversos polissacarídeos foram dosados pelo método do carbazol (32), na qual se usa uma modificação da reação de carbazol de Dische, incluindo-se o íon borato, para aumentar a intensidade e a rapidez de aparecimento da cor na reação. A curva padrão foi feita usando-se o ácido glucurônico. As leituras foram feitas numa densidade óptica de 530 nm.

1.5- Métodos cromatográficos (cromatografia de partição)

1.5.1- Cromatografia em papel

Os cromatogramas em papel foram feitos em papel Whatman nº 1, no caso das análises qualitativas e em papel Whatman 3 MM para as preparativas. Os cromatogramas foram desenvolvidos pelo método ascendente ou descendente no caso das qualitativas e apenas descendente para as preparativas. Os sistemas de solventes utilizados foram: (A) butanol-etanol-água (3:2:2), (B) butanol-etanol-água (2:1:1), (C) butanol-piridina-água (5:3:3) (64). A revelação dos cromatogramas foi efetuada com os reagentes de nitrato de prata alcalino, onde ocorre a formação de óxido de prata a partir do nitrato de prata e do hidróxido de sódio (100). Fez-se pequenas modificações: usou-se 1 ml da solução saturada de nitrato de prata para 250 ml de acetona e hidróxido de sódio a 33% diluída na proporção de 1:25 em etanol, sendo que este último não foi borrifado (usou-se imersão). O excesso de soda foi removido por imersão em solução de tiossulfato de sódio em água a 5%, e o excesso de tiossulfato foi retirado por água corrente. A revelação também foi efetuada com cloridrato de para-anisidina, (67) para açúcares redutores. Os padrões utilizados foram ácido glucurônico, galactose, arabinose e ramnose.

1.5.2 -Cromatografia de gel permeação (peso molecular)

A massa molecular aproximada dos polissacarídeos foi determinada em coluna cromatográfica de Sepharose CL-4B, (49) de

32 cm de altura por 1,0 cm de diâmetro, utilizando-se como eluente NaCl 1 M. (16). O volume morto foi definido pelo Blue Dextran 2000 e as dosagens de açúcar total foram feitas pelo método do fenol-sulfúrico, já descrito. Fez-se uma curva padrão utilizando-se padrões de dextrana de diferentes pesos moleculares: 266.000, 500.000 1000.000 e 2000.000. Plotou-se os seus $K_{av}(s)$ na ordenada enquanto os pesos moleculares ficaram na abcissa. Através desta curva chegou-se a um valor aproximado dos pesos moleculares dos polissacarídeos.

1.5.3- Cromatografia líquida-gasosa (g.l.c.)

A cromatografia líquida-gasosa (g.l.c) foi executada em Cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama e utilizando-se nitrogênio como gás de arraste (37,5 ml/min). A temperatura utilizada foi de 240° C para o detector e 220°C para a câmara de injeção. Empregou-se coluna de aço inoxidável (200 cm x 0,15 cm d.i.) empacotada com ECNSS-M a 3% (p/p), sobre gás Chrom Q de 100-120 mesh. Utilizou-se esta coluna para a determinação quantitativa dos acetatos de alditóis (temperatura de 180°)(91) e também dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (temperatura de 170°C). Os tempos de retenção foram dados em relação ao xilitol penta-O-acetato e ao 1,5-di-O-acetil- 2,3,4,6 -tetra-O-metil-D-glucitol para os acetatos de alditóis e

alдитóis acetatos parcialmente metilados, respectivamente. As áreas registradas para cada componente, foram trianguladas e então calculou-se a composição molar dos polissacarídeos (70).

1.6- Hidrólise ácida total

As hidrólises ácidas totais (20, 77, 89) para a elucidação das composições monossacarídicas dos polissacarídeos, foram realizadas com ácido trifluoracético normal (TFA), por 6 a 8 horas em estufa a 100°C. Utilizou-se 10 mg do material a ser hidrolisado e 2 ml do ácido. Terminada a hidrólise evaporou-se o TFA em evaporador rotatório, lavou-se com água até que não houvesse mais odor do ácido e o material seco, redissolvido em pequena quantidade de água, foi cromatografado e ou reduzido e acetilado, conforme metodologia descrita adiante.

1.7- Redução e acetilação dos produtos de hidrólise total

A hidrólise dos polissacarídeos produziu misturas de monossacarídeos, que tiveram as suas carbonilas reduzidas a álcool, pelo boroidreto de sódio (NaBH_4) (1, 103, 104). O boroidreto de sódio foi acrescentado, até pH 10 à temperatura ambiente; deixou-se por 12 horas aproximadamente. Decorrido este período, o material reduzido foi tratado com resina catiônica Dowex 50W x 8 (forma H^+), com a finalidade de remover os íons sódio (Na^+) (64, 89). Filtrou-se a solução

por algodão e evaporou-se com evaporador rotatório até secura; o ácido bórico que resultou deste tratamento foi eliminado por codestilação com o metanol na forma de borato de metila. Procedeu-se então a acetilação (103) dos alditóis obtidos usando-se 1 ml de anidrido acético e 1 ml de piridina (mistura 1:1 v/v - 2 ml), à temperatura ambiente e deixando-se por 12 a 24 horas. Passado este intervalo de tempo a acetilação foi interrompida pela adição de gelo moído, que converte o anidrido acético em ácido acético. Então extraiu-se com clorofórmio os açúcares acetilados, por agitação manual. Após a eliminação da água, a piridina foi removida por tratamentos sucessivos com sulfato de cobre a 2%. Tal processo foi repetido por diversas vezes, até não mais observar a presença de piridina. O clorofórmio foi então lavado com água, por várias vezes para retirar o sulfato de cobre. Feito isto, adicionou-se sulfato de sódio anidro, para remover possíveis resíduos de água e posteriormente filtrou-se por algodão e deixou-se para evaporar naturalmente. Os acetatos de alditóis foram então analisados por g.l.c. ou g.l.c.-m.s. conforme descrito.

1.8- Teor de umidade

O teor de umidade do polissacarídeo original foi determinado em estufa a 100°C, pelo período de 24 ou 48 horas, comparando-se os pesos, antes e depois da secagem (94).

2- Coleta e preparação da goma de *Anadenanthera colubrina*

O exsudato de *Anadenanthera colubrina* foi coletado em Curitiba (Paraná), em dois locais diferentes: no bairro Alto da Glória e no Centro Cívico. O exsudato encontrado em árvores que se localizam nas laterais das ruas, nas ciclo-vias e nas praças destes bairros foi coletado com o auxílio de instrumentos como facas e espátulas, procurando-se evitar os pedaços de madeira que tendem a vir com o exsudato. O material coletado foi dissolvido em água fria por agitação e depois filtrado usando-se um pedaço de tecido, de modo a eliminar os pedaços de casca e pequenas impurezas presentes. A goma limpa foi então liofilizada e pesada.

3- Obtenção do polissacarídeo

O exsudato liofilizado (136,1 g) foi dissolvido em 600 ml de água e acrescido de 1400 ml de metanol (70%) quando então ocorreu um pouco de precipitação do polissacarídeo. Adicionando-se alguns mililitros de solução de acetato de sódio saturada, a precipitação aumentou significativamente e completou-se quando o sistema foi levado à baixa temperatura. Por centrifugação separou-se o precipitado do sobrenadante; o polissacarídeo foi submetido à diálise em água corrente para eliminação do sal e posteriormente liofilizado e pesado (101.7 g).

4- Metilação dos polissacarídeos

Pesou-se aproximadamente 30 mg do polissacarídeo dialisado e liofilizado e tratou-se a amostra com boroidreto de sódio, à temperatura ambiente, como descrito anteriormente. Após a redução neutralizou-se com ácido acético e dializou-se contra água corrente, por 20 horas aproximadamente. A fração não dialisável foi evaporada até a secura e submetida à metilação, segundo processo descrito por Haworth (59). Ao polissacarídeo com sua ponta redutora reduzida, foi adicionado aproximadamente 2,0 ml de hidróxido de sódio, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Em seguida fez-se uma adição de sulfato de dimetila de 0,5 ml e depois de um intervalo de tempo, outra de 0,5 ml. Assim foram feitas adições da base e do agente metilante repetidas vezes, sempre controlando o pH (para que se mantivesse básico) e mantendo a proporção de 2 da base para 1 do sulfato de dimetila. Este processo foi repetido por três dias consecutivos e no quarto dia o processo de metilação foi interrompido levando-se o material a um banho maria a 100 °C por 45 minutos para que ocorresse decomposição do sulfato de dimetila excessivo. Em seguida resfriou-se até uma temperatura de 0 a 2°C em banho de gelo e neutralizou-se o meio com ácido acético glacial, para então levar-se à diálise contra água corrente durante 72 horas e depois em água destilada, por 24 horas. A próxima etapa, foi liofilizar o polissacarídeo e submetê-lo ao tratamento com

óxido de prata e iodeto de metila, de acordo com o método descrito por Purdie e modificado por Kuhn et al. (74).

O polissacarídeo da etapa anterior, foi solubilizado em dimetilformamida. Adicionou-se no primeiro dia 1 g de óxido de prata e 2 ml de iodeto de metila, com agitação constante à temperatura ambiente. No segundo e terceiro dias fez-se mais duas adições semelhantes à primeira, sendo que o balão esteve envolto em papel alumínio todo o tempo, para que a reação se processasse no escuro. Depois de 72 horas interrompeu-se a metilação e levou-se o polissacarídeo supostamente metilado à diálise contra água corrente por 24 horas. Fez-se então uma extração exaustiva do material com diclorometano, filtrou-se por papel e evaporou-se o filtrado até à secura, em rotaevaporador, à baixa temperatura (20°C).

O método de metilação de Hakomori foi também usado (86). Primeiramente o ânion metilsulfinil foi preparado, da seguinte maneira: num frasco de 500 ml de duas bocas, colocou-se 11,48 g de hidreto de potássio, que foi submetido a uma lavagem com três porções sucessivas de éter de petróleo, eliminadas após a decantação do material. No dia seguinte após fazer a última decantação, retirou-se o restante do éter de petróleo através de uma bomba de vácuo. Colocou-se 50 ml de DMSO (ao mesmo tempo deixou-se fluindo o gás nitrogênio) e encaixou-se o balão num condensador, aquecido a 50°C e sob agitação. Deixou-se a temperatura subir um pouco mais (até 60°C) e cronometrou-se 45 minutos. O material adquiriu uma coloração

verde musgo. O dimetilsulfinil carbânion foi titulado com HCl 0,1 N e sua molaridade foi calculada em 12,5 M.

A metilação propriamente dita foi executada como segue: o polissacarídeo metilado pelo método de Haworth, foi colocado num pequeno balão bem seco e contendo uma barra magnética. Acrescentou-se 2 ml de DMSO e deixou-se sob agitação constante, até o dia seguinte, mantendo-se o frasco bem vedado. No dia seguinte colocou-se rapidamente o ânion (2 ml), que depois de 5 minutos apresentou-se amarelado. Depois de 10 minutos mostrou-se amarelo-esverdeado. Deixou-se sob agitação constante por quatro horas. Feito isso, adicionou-se 2,5 ml de iodeto de metila, mantendo-se o material mergulhado num banho de água com gelo (10-20°C) e deixou-se agitando por 10 minutos. O material apresentou uma coloração bem mais clara. Fez-se a extração do material metilado com clorofórmio, por 3 vezes e levou-se à diálise contra água corrente por 24 horas, evaporou-se à vácuo e liofilizou-se. O processo de metilação foi repetido no dia seguinte. O polissacarídeo permetilado, foi então metanolisado conforme técnica descrita adiante, reduzido, acetilado e analisado por g.l.c.-m.s. como já descrito.

5- Metanólise dos produtos metilados

Os produtos da metilação, evaporados à secura foram metanolisados da seguinte maneira; introduziu-se 3 ml de HCl

gasoso em aproximadamente 100 ml de metanol e adicionou-se este material aos produtos metilados (3 ml); deixou-se sob refluxo a 80°C por 2 a 4 horas e depois neutralizou-se o mesmo com carbonato de prata, filtrou-se, lavando-se o resíduo com metanol e evaporou-se à vácuo (68).

A etapa subsequente foi fazer a hidrólise ácida total, com H_2SO_4 1 M, por 8 horas, a 100°C. Em seguida neutralizou-se com carbonato de bário, filtrou-se e prosseguiu-se com as técnicas de redução e acetilação já descritas.

6- Hidrólises ácidas parciais do polissacarídeo

Pesou-se 3 g do polissacarídeo liofilizado e levou-se até pH 1,5 com ácido sulfúrico 0,5 M. A hidrólise processou-se a 100 °C por uma hora, quando então aproximadamente metade do material foi retirada, neutralizada com carbonato de bário, filtrada, precipitada com etanol a 70% e centrifugada. No sobrenadante ficaram as unidades removidas pela hidrólise e no precipitado o polissacarídeo da primeira hora chamado de "A", que foi dialisado, liofilizado e pesado.

O restante da amostra continuou sendo hidrolisada por mais uma hora, num total de duas horas de hidrólise. Procedeu-se exatamente como na primeira hora e obteve-se a goma degradada "B". Os sobrenadantes foram também liofilizados, hidrolisados, reduzidos e acetilados como descrito anteriormente. Este tratamento foi feito também com os polissacarídeos A e B de

forma que polissacarídeos e sobrenadantes foram estudados por g.l.c.-m.s.. Os pesos moleculares dos polissacarídeos foram apurados, como descrito no item 1.5.2. Os polissacarídeos A e B também tiveram seus conteúdos de ácido urônico dosados.

7- Degradação sequenciada de Smith

Pesou-se 3g do polissacarídeo dialisado e oxidou-se com metaperiodato de sódio (46, 52, 60). Dissolveu-se o polissacarídeo em 250 ml de água destilada, com agitação e adicionou-se 250 ml de solução de meta periodato de sódio 0,1 M (concentração final 0,05 M). O erlenmeyer foi envolto em papel alumínio e deixado sob ausência de luz por 72 horas à temperatura ambiente.

A oxidação foi interrompida com a adição de 20 ml de etileno glicol, deixando sob agitação por 30 minutos. Depois, o polissacarídeo oxidado foi dialisado contra água corrente por 48 horas. Terminada a diálise, o material foi evaporado até pequeno volume e depois sofreu redução com NaBH_4 como descrito anteriormente. O excesso de boroidreto foi destruído pela adição cuidadosa de ácido acético 2M à temperatura ambiente e o poliálcool foi dialisado contra água corrente por 24 horas.

A fração não dialisável foi evaporada a vácuo, até a secura e pesada. Separou-se 10 mg deste material e com o restante procedeu-se a hidrólise branda de Smith, conforme

Gorin e Iacomini (com alguma modificação) adicionando ácido sulfúrico até pH 2,0 e levando-se o sistema por 30 minutos a um banho maria de 70°C. Após resfriamento, fez-se uma precipitação do material com metanol, levou-se ao freezer e depois centrifugou-se, separando o sobrenadante do precipitado, que foi posteriormente dialisado e liofilizado e que corresponde então ao polissacarídeo I (produto da primeira degradação de Smith).

Do polissacarídeo I, retirou-se uma pequena alíquota (o suficiente para proceder as demais análises) e com o restante fez-se uma segunda oxidação por periodato, exatamente nas mesmas condições em que a primeira foi feita (respeitadas as proporções). Procedeu-se também, com este segundo polialdeído, a redução, formando o poliálcool II. Com a subsequente degradação de Smith branda, chegou-se ao polissacarídeo II (produto da segunda degradação de Smith).

As alíquotas que foram retiradas dos poliálcoois, sofreram redução e acetilação para serem estudadas por g.l.c.- m.s. As alíquotas dos polissacarídeos I e II foram destinadas à dosagem de ácido urônico, estudadas por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r e também por g.l.c.-m.s..

8- Isolamento e purificação do ácido aldobiurônico

Dois gramas do polissacarídeo original, liofilizado foram hidrolisados com ácido trifluoracético (TFA) 1M (25 ml) por

8 horas a 100°C . Certificou-se da presença do ácido aldobiurônico por cromatografia em papel Whatman nº1, usando-se a técnica descendente e o sistema de solventes B. Aplicou-se então o material hidrolisado (depois de evaporado o TFA em evaporador rotatório) a uma coluna de Sephadex, G-10 e G-15 de 43 cm de altura por 2 cm de diâmetro, da qual se coletou alíquotas de 5 ml, por eluição com água. Fez-se então a dosagem de ácido urônico pelo método do carbazol (32) e dos açúcares totais pelo fenol-sulfúrico (45). As amostras que demonstraram ter maior quantidade de ácido urônico foram reunidas, evaporadas e aplicadas em cromatografias preparativas utilizando-se papel Whatman 3 MM, pela técnica descendente e sistema de solventes B. Destes cromatogramas, foi eluído com água o ácido aldobiurônico puro (2, 101). Uma segunda forma de purificar o ácido aldobiurônico foi aplicar o material hidrolisado, em coluna de carvão-Celite (3,2 cm de altura por 9,5 cm de diâmetro). Fez-se eluição com 1500 ml de água, seguida de 500 ml de etanol a 30% e depois 1000 ml de etanol a 40%. Monitorou-se por cromatografia em papel, em qual fração saía o ácido urônico. Evaporou-se então, a fração adequada e aplicou-se em cromatografia preparativa como descrito antes.

9- Identificação do ácido aldobiurônico

9.1- Identificação do monossacarídeo neutro

O ácido aldobiurônico puro, foi submetido a uma hidrólise ácida mais forte que a usual, com TFA 3M, a 100°C, por 6 horas. Depois de evaporado o ácido, cromatografou-se a amostra em papel Whatman nº1, ao lado de padrões como galactose, arabinose além do padrão de ácido urônico, utilizando-se o sistema de solventes B e revelando-se com nitrato de prata.

9.2- Identificação do ácido urônico

Fez-se a redução do grupamento carboxílico do ácido urônico, utilizando-se 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (99). Em seguida fez-se hidrólise total do ácido aldobiurônico reduzido, com TFA 1M, por 8 horas a 100°C, evaporou-se e fez-se cromatografia em papel, utilizando o sistema de solventes C, pela técnica ascendente.

9.3- Estudo do aldobiurônico por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. e de ^1H -n.m.r.

O ácido aldobiurônico foi estudado por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. e de ^1H -n.m.r. Dentro da ^{13}C -n.m.r., pelas técnicas Inversa (^1H ,X Correlation via ^1H Detection) e DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).

10- Análise por cromatografia líquida-gasosa acoplada a espectrometria de massa (g.l.c.- m.s.)

A cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa foi realizada com os derivados acetatos de alditóis e

acetatos de alditóis parcialmente metilados, em espectrômetro de marca Finnigan, MAT munido com ITS-40. Usou-se coluna capilar OV-225 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. O gás de arraste foi o hélio ultrapuro, com um fluxo de 2ml por min.

A programação da temperatura foi: temperatura inicial de 50° C durante 1 minuto, seguindo-se após este tempo, um gradiente de 40°C/min até 220°C, mantendo-se isotérmica até o final da análise.

11- Análise por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. e ^1H -n.m.r.

11.1 - Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r.

Os espectros de ressonância nuclear magnética de C-13 foram obtidos pelo uso de um espectrômetro Bruker CPX 300 incorporado ao transformador de Fourier. Os polissacarídeos A, B, I, II e o ácido aldobiurônico foram examinados em solução de D_2O (10-100 mg). Estas soluções de 0,5 ml foram colocadas em um tubo de 20 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro e mantidas a 33°C, para serem então analisadas no espectrômetro (54). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m.), relativos à ressonância do TMS (Me_4Si) determinada em experimento separado.

11.2 - Espectroscopia de ^1H -n.m.r.

As análises de próton (^1H -n.m.r.) foram feitas num espectrômetro Bruker CPX 300 incorporado ao transformador de Fourier em 300 MHz em relação ao núcleo de próton. Os carboidratos foram analisados dissolvidos em D_2O , posteriormente colocados em tubos de 20 x 5 mm d.i. e mantidos a 33°C para serem analisadas no espectrômetro. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m.), relativos à ressonância do Me_4Si externa ($\delta = 0$), determinada em experimento separado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DESCRIÇÃO DA PLANTA

A árvore de onde se extraiu o exsudato para estudo tem os seguintes nomes: *Piptadenia colubrina* Bth, *Acacia colubrina* M; *Acacia peregrina* Kunth e *Mimosa colubrina* Vell (43). Tem ainda uma outra denominação mais recente de *Anadenanthera colubrina*, segundo o professor Gert Hatschbach. É conhecida como Angico Branco e aqui no Paraná mais frequentemente como Monjoleiro. No estado do Paraná aparece em municípios como Rio Branco do Sul, Ponta Grossa, Jaguaraíva, Arapoti, Cianorte, Terra Boa, Santo Antônio da Platina, Cândido de Abreu, Tomazina e outros.

Esta árvore, segundo Joly (42) pertence à divisão Angiospermae, à classe dicotiledônea, à ordem Rosales, e é da família Leguminosae. Dentro da família das Leguminosae, que é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, existem mais de 600 gêneros, que reúnem mais de 13.000 espécies, as quais estão distribuídas pelo mundo, principalmente em regiões subtropicais e tropicais (69). Porém, segundo Arthur Cronquist*, a família Leguminosae é uma "superfamília", pertencente à ordem Fabales, e que apresenta três subfamílias, sendo as duas maiores, a Mimosaceae e a Caesalpinaceae. No caso da *Anadenanthera*

* Arthur Cronquist. "An integrated system of classification of flowering plants". New York, p. 588-595, 1981.

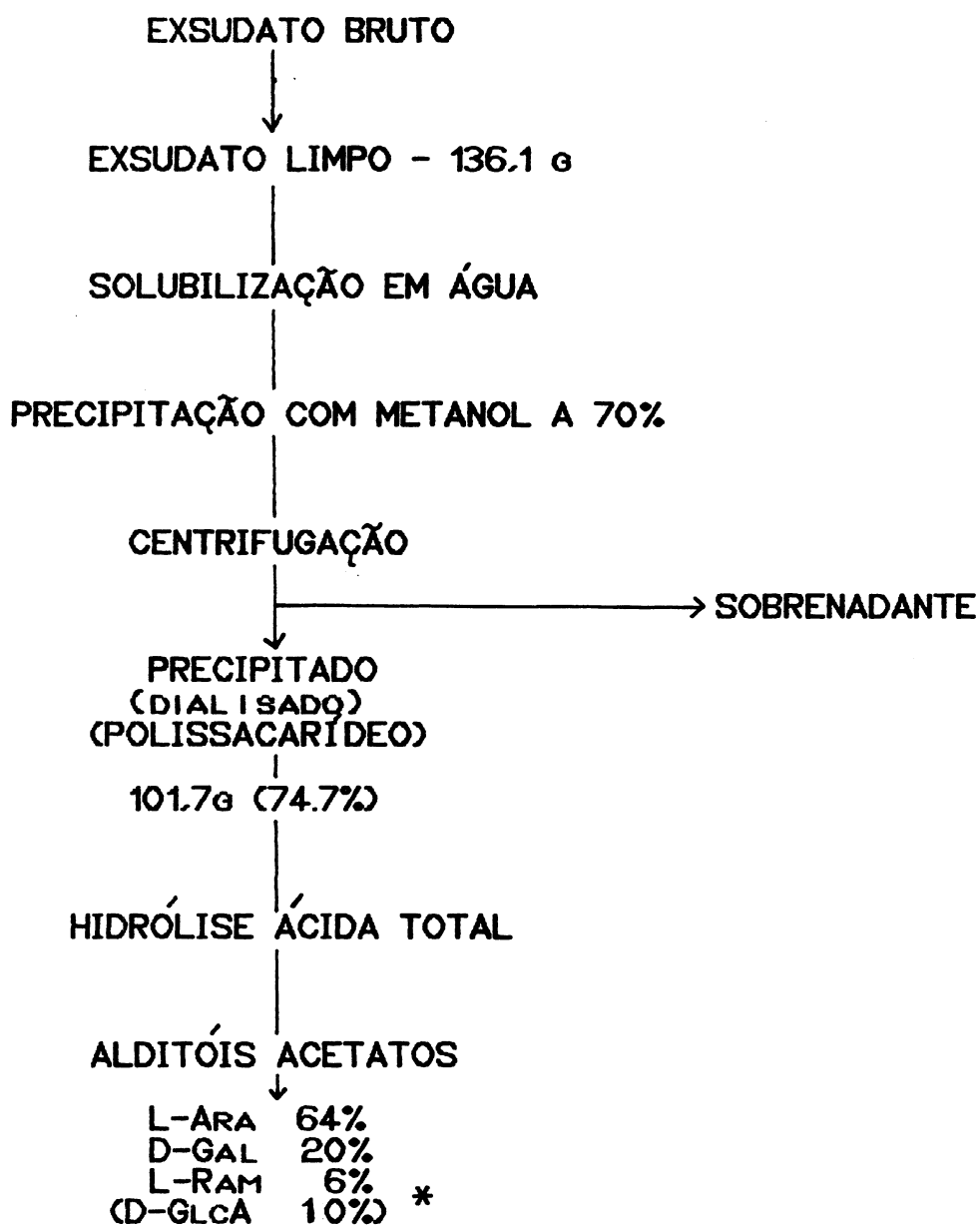
colubrina, esta pertence à subfamília Mimosaceae.

É uma árvore de caule liso, atingindo até 15 m de altura, madeira avermelhada ou pardo-escura. A casca é amarga, encerra 32% de tanino e tem emprego na indústria de cortume. Exsuda goma empregada na indústria e também contra as afecções pulmonares e das vias respiratórias. No Brasil, ocorre desde o Maranhão até o Paraná (43). Ocorre também em Goiás na floresta pluvial, em altitudes superiores a 400 metros. E em termos de América do Sul, ocorre desde a Colômbia até Brasil.

POLISSACARÍDEO ORIGINAL

COMPOSIÇÃO

O polissacarídeo de *Anadenanthera colubrina* foi obtido de acordo com o Esquema I, onde o exsudato limpo (136,1g) (exsudato bruto livre dos pequenos pedaços de casca e sujeiras) foi precipitado por metanol a 70% e o sedimento obtido por centrifugação, solubilizado, foi posteriormente dialisado contra água corrente e liofilizado, apresentando um peso de 101,7g, com rendimento de 74.7% em peso, em relação ao material de partida. O mesmo mostrou-se após passagem por coluna de Sepharose CL-4B, com um peso molecular aproximado de $1,6 \times 10^6$. Esta macromolécula apresentou um teor de umidade de 13% e um conteúdo de proteínas de 2,3%, que pode ser considerado muito pequeno se comparado ao de gomas como



ESQUEMA I PURIFICAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina.

* dosado pelo carbazol.

Combretum hartmannianum (63%) e de *Acacia erioloba* (53 a 56%)

Este material por hidrólise ácida total e posterior redução, acetilação e análise por g.l.c.-m.s. mostrou-se composto de arabinose em maior quantidade (64,0%) seguida de galactose (20,0%), ramnose (6,0%) e de ácido urônico (dosado pelo carbazol) (10,0%).

Desta forma, o polissacarídeo ficou classificado como uma arabinogalactana, como a maioria dos exsudatos isolados do gênero *Acacia* e boa parte de outros gêneros (3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 24, 38 e outros).

Análise de metilação

Pelos dados de metilação apresentados na Tabela I (p. 56), pode-se concluir que há uma alta ramificação nesta estrutura, onde observa-se a presença das ligações (1→5) das unidades de arabinofuranose, pela presença dos derivados metilados 2,3-Me₂-Ara e 2-Me-Ara, bem como a presença da ligação (1→3) que se representa pelos derivados 2,5-Me₂-Ara e da ligação (1→2), que se evidencia pela presença do derivado 3,5-Me₂. Pode-se ver bem que as unidades de ramnose são terminais, devido à presença do derivado 2,3,4-Me₃-Ram. Também podemos observar que há pouco galactose terminal, a qual é encontrada somente em 2%, pela presença do derivado 2,3,4,6-Me₄-Gal. Observa-se, entretanto, um elevado percentual (20%) do derivado 2,4-Me₂-Gal comprovando a ramificação das unidades de galactose em C-3 e C-6

TABELA 1 ANÁLISE POR METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL
DO EXSUDATO DE Anadenanthera colubrina.

DERIVADO METILADO	TIPO DE LIGAÇÃO	PERCENTUAL MOLAR (%)
2,3,5- ME ₃ -ARA	E.N.R.-ARA	28
2,3-ME ₂ -ARA	→5)-ARA-(1-	5
2,5-ME ₂ -ARA	→3)-ARA-(1-	8
3,5-ME ₂ -ARA	→2)-ARA-(1-	9
2-ME-ARA	→3)-ARA-(1- 5 ↑ 1	13
2,3,4-ME ₃ -RAM	E.N.R.-RAM	5
2,3,4,6-ME ₄ -GAL	E.N.R.-GAL	2
2,4,6-ME ₃ -GAL	→3)-GAL-(1-	7
2,3,4-ME ₃ -GAL	→6)-GAL-(1-	3
2,4-ME ₂ -GAL	→3)-GAL-(1- 6 ↑ 1	20

Obs.: (a) As análises foram realizadas por g.l.c.-m.s., em coluna capilar OV-225, estando o material na forma de alditóis acetatos parcialmente metilados.

(b) E.n.r. = Extremidade não redutora.

A quantificação do ácido glucurônico pelos dados de metilação não foi realizada, mas sabe-se como se verá adiante, que o C-1 do ácido glucurônico está ligado ao C-6 das unidades de galactose. Algumas literaturas mostram que é comum encontrar-se unidades de ramnopirranose ligadas ao ácido urônico (24, 38, 44). Este fato pode também se dar no polímero em estudo, pois a ramnose foi caracterizada como extremidade não redutora. Observa-se, porém em algumas literaturas que o ácido glucurônico posiciona-se como terminal não redutor (12, 29, 92, 98). Embora estudos por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., como será visto adiante, mostrem poder existir no polímero estas duas formas, somente estudos posteriores, de maior profundidade poderão esclarecer isto completamente.

A análise de metilação deste polissacarídeo foi bastante complexa e merece um estudo futuro mais cuidadoso, realizando a metilação dos polissacarídeos I e II, obtidos pela degradação de Smith, bem como dos polissacarídeos A e B, obtidos pelas hidrólises ácidas parciais e dos oligossacarídeos produzidos por essas mesmas técnicas, de forma que obteremos maiores esclarecimentos sobre as ligações glicosídicas e as substituições presentes neste polímero.

Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r.

O polissacarídeo do qual já se conhecia a composição e do qual já tínhamos algumas informações de tipos de ligação das

suas unidades monossacarídicas pelos dados de metilação, foi então estudado por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., para se ter uma idéia mais abrangente sobre a sua estrutura. Chegou-se a um espectro bastante complexo, mostrado na Figura I (p.59), onde observa-se na região de C-1, um grande número de sinais compreendidos entre a faixa de δ 99 a δ 111. Este grande número de sinais leva a concluir que se trata de um polímero altamente complexo. Destacam-se os sinais de δ 111.0, 110.2 e 109.8, que conforme a literatura (33, 34, 83, 87, 90) são relativos ao C-1 de arabinofuranoses externas e internas, respectivamente. O fato de aparecer vários sinais também indica que neste polímero as unidades de arabinofuranose estão ligadas de diferentes maneiras, ou seja, por diferentes tipos de ligações ou mesmo por estarem ligadas a diferentes unidades. Dentre os outros sinais desta região, aquele de δ 105.2 corresponde às unidades β de galactopirranose (C-1), provavelmente ligadas por (1 $\rightarrow$ 3) (44, 54, 56, 83, 87). O sinal de δ 83.0 corresponde ao C-3 das galactopirranoses 3-O substituídas e aparece neste espectro acompanhando o de δ 105.2. Quanto ao pico de δ 104.4, este corresponde provavelmente ao C-1 de unidades do ácido urônico (44) e é acompanhado pelo sinal de δ 176.0 correspondente à carboxila do mesmo, em C-6, como pode ser observado na Figura I (44). Pela ausência de sinais em δ 58.9 a δ 61.1 (83, 90) vê-se que o ácido 4-O-metilglucurônico não está presente neste polissacarídeo. Tratando-se ainda do GlcA, observa-se um sinal em δ 80.6 que pode ser atribuído ao C-4, que encontra-se

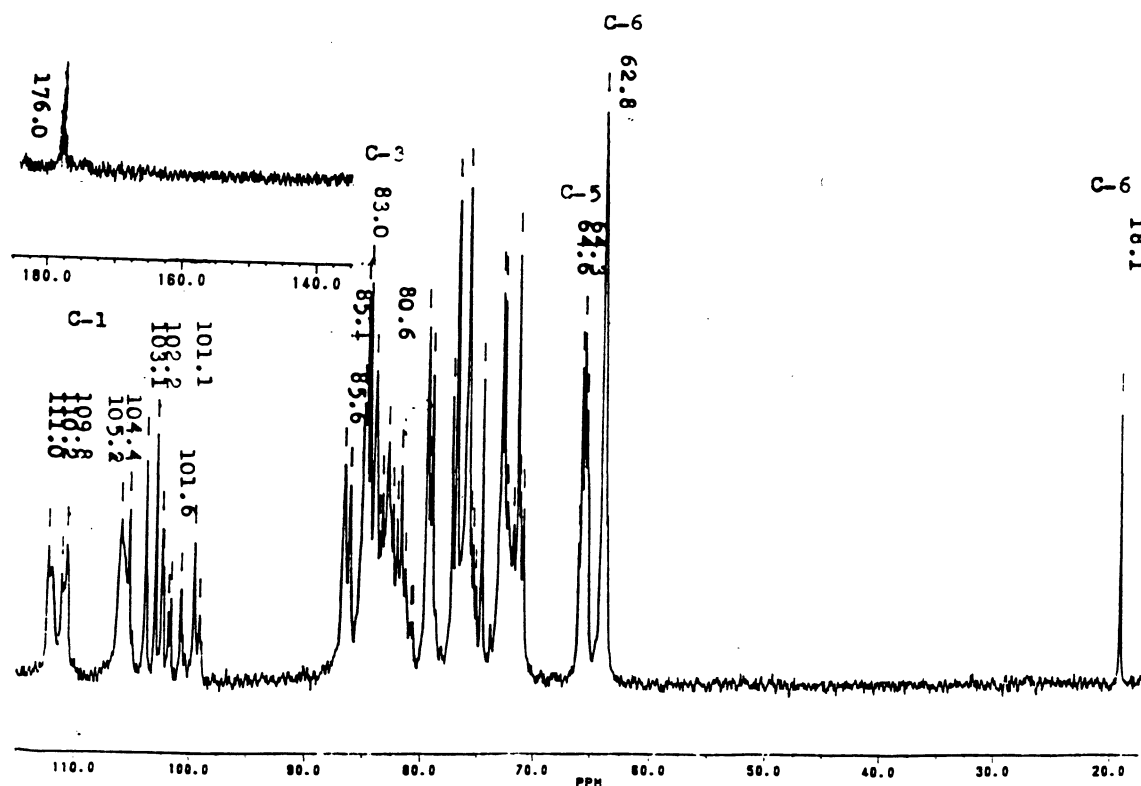


FIGURA I ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DO EXUDATO DE Anadenanthera colubrina, EM ÓXIDO DE DEUTÉRIO (D_2O) A 50°C . OS VALORES NUMÉRICOS SÃO BASEADOS NO VALOR DO TMS ($\delta=0$).

substituído. Sobre os sinais da região de C-1, em δ 103.1, δ 102.2 e δ 101.1, dada a complexidade do polímero preferiu-se nada concluir, por hora. É possível que um destes sinais ou dentro de um destes sinais haja um sinal de C-1, de galactopiranoses 6-O substituída, ou mesmo 3-O e 6-O substituídas ao mesmo tempo. Estudos posteriores, incluindo o estudo de vários oligossacarídeos poderão talvez esclarecer o significado destes sinais. Em δ 101.6 encontra-se um sinal que corresponde provavelmente ao C-1 das unidades de α -L-ramnose (44). O mesmo é acompanhado por um outro em campo alto, de δ 18.1, correspondente, segundo a literatura ao CH_3 das desoxihexoses, que neste caso é a ramnose (44).

Na região compreendida entre δ 79 e 86, encontramos os sinais de δ 85.6 e δ 85.1 que são referentes aos C-4, não glicosídicos, das unidades de α arabinofuranose (37, 44, 83), ou seja, seriam os sinais hemiacetálicos, correspondentes a estas unidades furanosídicas.

A região que vai de δ 67 e δ 77 onde aparecem os sinais dos carbonos C-2 a C-4 das arabinofuranoses (83) mostra-se também bastante densa, característica esperada em uma molécula complexa como esta.

O grupamento CH_2OH livre, correspondente ao C-6 da galactose aparece em δ 62.8 (44). Os sinais correspondentes ao C-5 da pentose aparecem em δ 64.3 e 64.6 (56), indicando que para este polímero temos pelo menos duas ligações diferentes para as unidades de arabinofuranose.

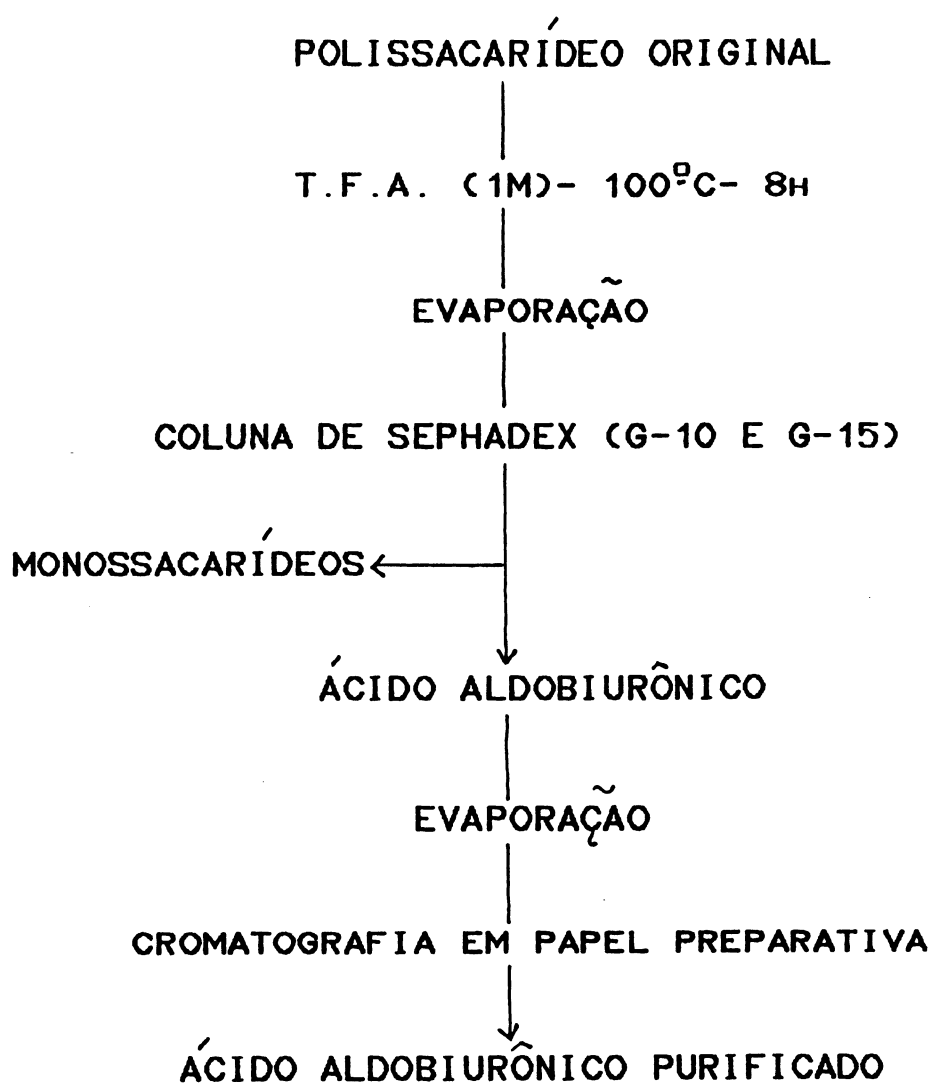
Através destes estudos preliminares de ^{13}C -n.m.r. pode-se deduzir então, que o polissacarídeo é uma arabinogalactana, onde as moléculas de arabinose são furanosídicas.

ÁCIDO ALDOBIURÔNICO

1 - Produção do ácido aldobiurônico

Para a obtenção do ácido aldobiurônico, procedeu-se uma hidrólise ácida, como descrito em Materiais e Métodos e exposto no Esquema II (p.63). Após cromatografia em papel, o material evaporado foi eluido em coluna Sephadex G-10, G-15 (49), como mostrado na Figura II (p.64). Nesta coluna, como podemos observar, foram eluidos primeiro o ácido aldobiurônico de maior peso molecular e por último os monossacarídeos. A eluição foi monitorada pela dosagem do ácido urônico e a dos monossacarídeos via método do carbazol (32) e do fenol-ácido sulfúrico (45) respectivamente.

Os volumes eluidos, onde havia maior concentração de ácido aldobiurônico, foram reunidos e então evaporados. Através de cromatografia em papel, observou-se que o ácido aldobiurônico de R_{Gal} 0,22 no solvente B não se encontrava completamente puro, porém a maior parte dos monossacarídeos livres produzidos por hidrólise ácida foram eliminados. Aplicou-se então este material em papel Whatman 3 MM (cromatografia preparativa) e obteve-se o ácido aldobiurônico puro.



ESQUEMA II PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO ALDOBIURÔNICO A PARTIR DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DO EXSUDATO DE Anadenanthera colubrina.

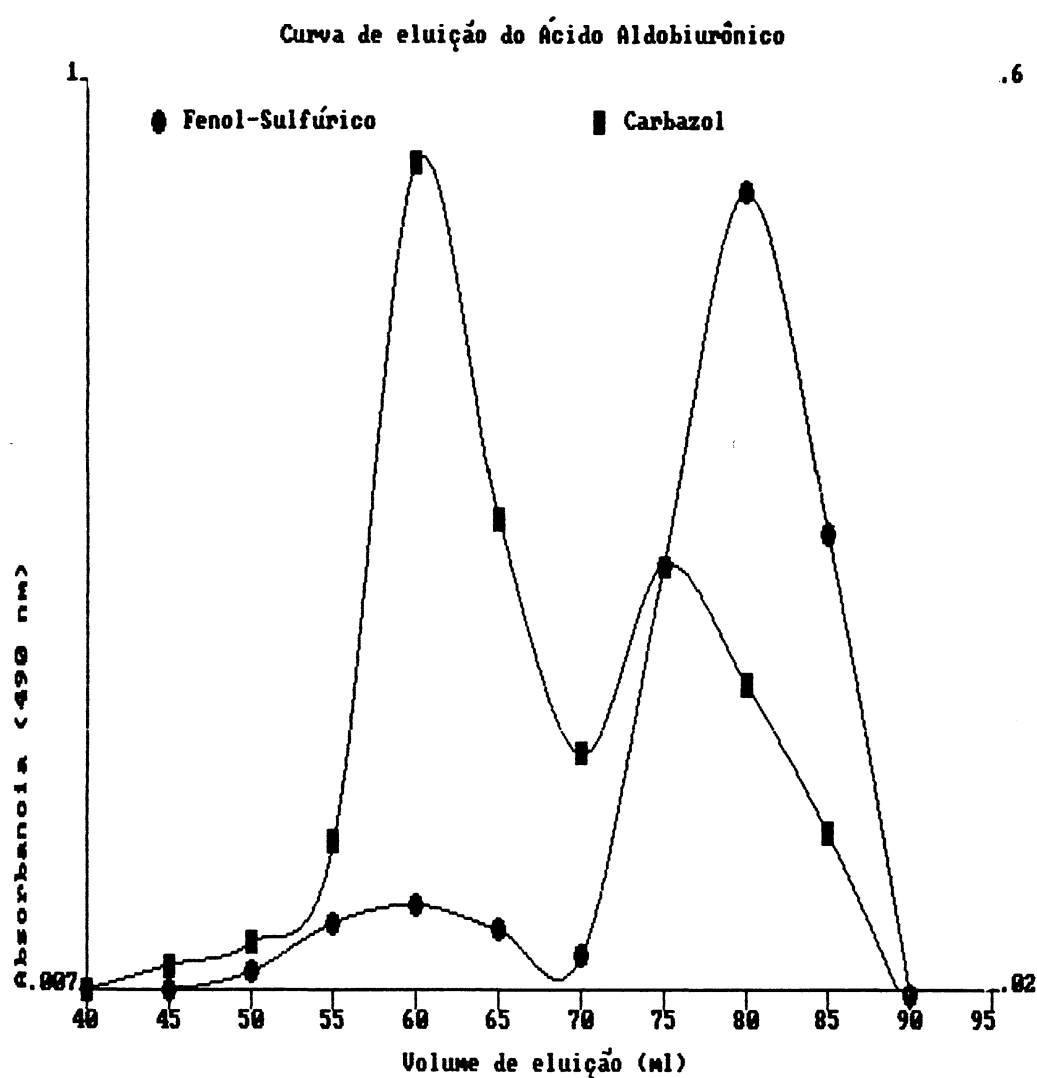


FIGURA II CURVA DE ELUIÇÃO DO ÁCIDO ALDOBIURÔNICO, OBTIDO DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina EM COLUNA DE SEPHADEX G-10 E G-15.

2- Componentes do ácido aldobiurônico

O ácido aldobiurônico puro, foi então submetido à hidrólise com uma solução ácida mais forte que a usual (TFA 3 M por 6 horas a 100°C), para romper a resistente ligação glicosídica do aldobiurônico, e cromatografado em papel. Obteve-se como resultado duas manchas- uma de $R_{Gal} 0,4$ e outra de $R_{Gal} 1.0$, sendo então a primeira correspondente ao ácido urônico e a última à galactose. Por este resultado deduzimos então que o ácido aldobiurônico é constituído por uma molécula de ácido urônico e por uma molécula de galactose.

3 - Identificação do ácido urônico

Para identificação do ácido urônico, fez-se redução do grupo carboxílico deste com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (99) e em seguida fez-se a hidrólise total do aldobiurônico reduzido. A cromatografia demonstrou a presença de uma mancha de $R_{Glc} 1.0$, levando a crer que o ácido urônico seria o ácido glucurônico, ou seja, este com sua carboxila reduzida forneceu glucose (e não galactose, que apareceria caso o ácido urônico presente fosse o galacturônico). A ponta redutora do aldobiurônico, como visto no item 2 é a galactose e também sofreu redução, fornecendo o galactitol (no cromatograma obtivemos uma mancha paralela ao padrão de galactitol aplicado). O ácido glucurônico é dos ácidos urônicos o de maior ocorrência

na família das Leguminosas, à qual pertence a árvore da goma em estudo. Isto se verifica principalmente nas Acácias (30). O ácido galacturônico também foi encontrado em estruturas de gomas (26, 80).

4- Espectroscopia de ^1H -n.m.r. do ácido aldobiurônico

O ácido aldobiurônico foi também estudado por ^1H -n.m.r. e por ^{13}C -n.m.r. No espectro de ^1H -n.m.r. (Figura III, p.67), observou-se na região de H-1, a presença de três sinais: o primeiro em campo mais alto, de aproximadamente δ 4.45 seria correspondente ao H-1 do ácido urônico (3). O segundo de δ 4.55 corresponde ao H-1 da hexose redutora (no caso a galactose) (3), ambos com configuração β e o terceiro em δ 5.35 correspondente à forma alfa redutora da galactose (48). Estas formas coexistem na proporção de 2:1 teoricamente e é interessante notar que atribuindo-se valor 1 à área do pico de H-1 do ácido urônico, encontra-se um valor de 0,64 para a área do pico de H-1 da galactose em β e aproximadamente a metade (0.34) para a forma α (2:1), como pode ser observado na Figura III. Estes valores de área viriam comprovar a existência de um dissacarídeo, onde existe um carbono anomérico redutor com dois sinais (α e β) distribuídos em três partes, na proporção de 1:1, para um outro carbono em β ; isto é, a somatória das duas áreas dos dois sinais de campo mais baixos se igualam a 1.

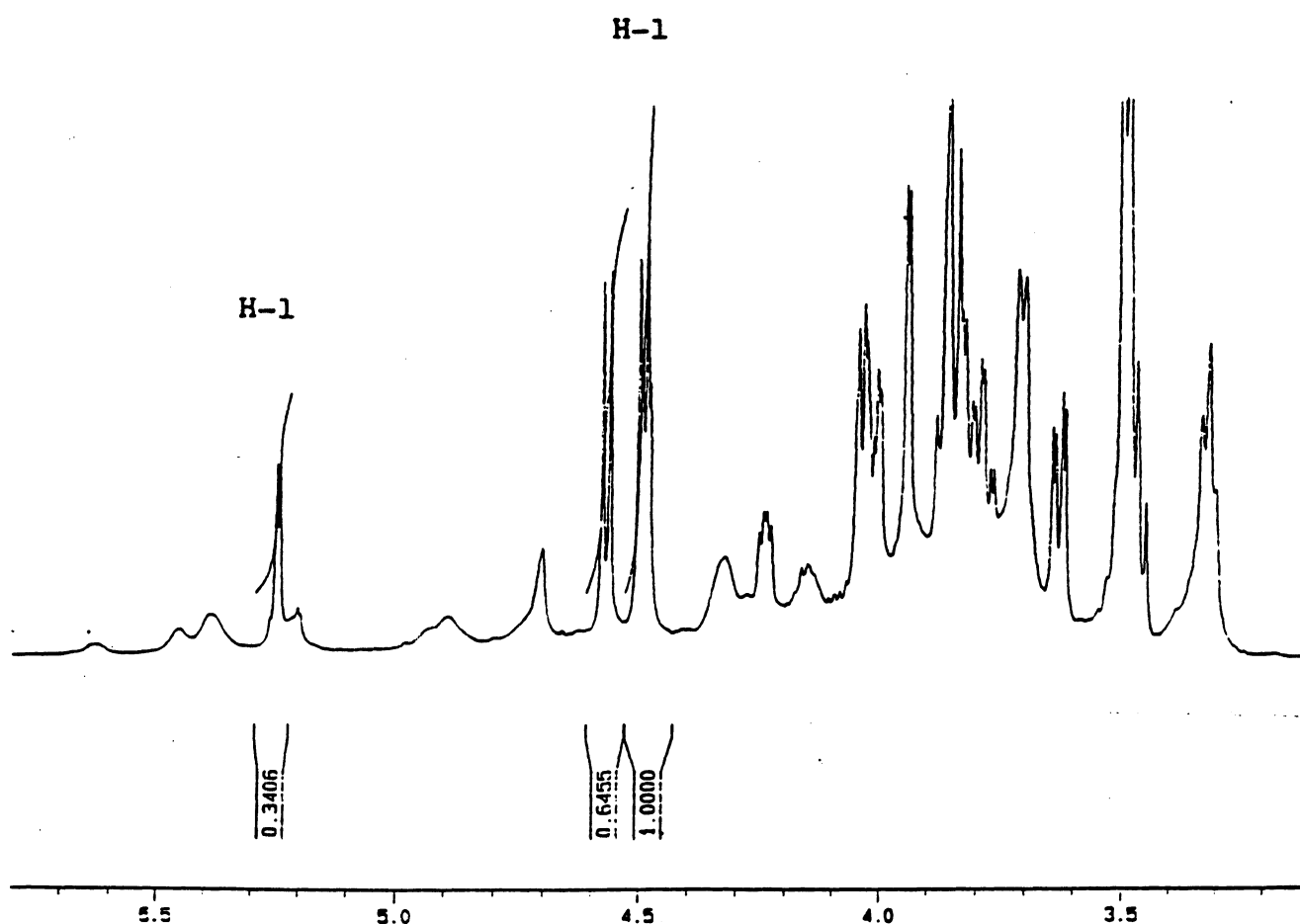


FIGURA III ESPECTRO DE ^1H -N.M.R. DO ÁCIDO ALDOBIURÔNICO DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina. OS VALORES SÃO BASEADOS NO SINAL DO TMS ($\delta=0$) E O SOLVENTE UTILIZADO FOI O D_2O .

5 - Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. do ácido aldobiurônico

No espectro de ^{13}C (Figura IV, p.69) evidenciam-se vários sinais importantes. Na região de C-1 o sinal de δ 104.5, equivale ao carbono anomérico do ácido glucurônico ligado em β (44), sendo que também já foi isolado em outras estruturas o ácido α -D-GlcA, e este apresenta seu sinal anomérico em δ 100 (56). Os sinais de δ 98.9 e δ 94.8 são referentes ao C-1 da galactose em configuração β e α respectivamente (56, 83), confirmando então os dados do espectro de próton. Na região de C-2 a C-5 que estão ligados glicosidicamente, não aparecem sinais, demonstrando que estes carbonos não estão envolvidos em ligações. Existem vários outros sinais na região de C-2 a C-4 não glicosilados, como seria de se esperar. É bom ressaltar que na região espectral onde se sinalizam CH_2OH livres para as hexoses piranosídicas (δ 61 a 63) (56, 83, 90) não há sinal. Ora, se o C-6 da galactose que é a única molécula onde se encontra um CH_2OH não está sinalizando, deduz-se que esteja ligado por ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 6). Este sinal que apareceria aproximadamente em δ 62.8 como no polímero original, está deslocado para campo mais baixo e mistura-se aos outros sinais aproximadamente em δ 71 (90).

Um outro sinal importante, é o de 176 ppm, correspondente ao grupo carboxílico (C-6) do ácido urônico (90)

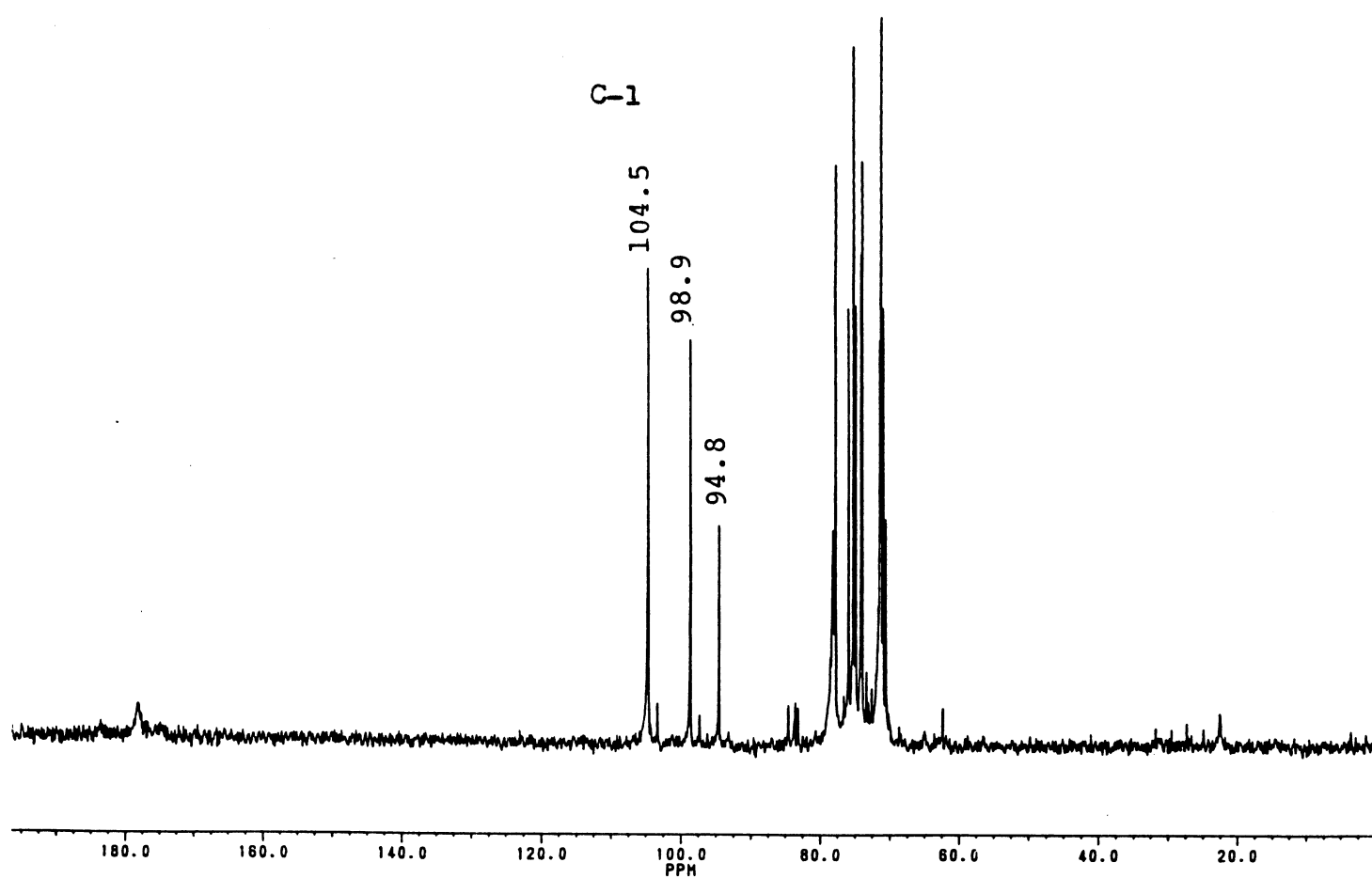


FIGURA IV ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DO ÁCIDO ALDOBIURÔNICO DO POLISSACARÍDEO DE Anadenanthera colubrina USANDO-SE D_2O A 50°C . OS VALORES NUMÉRICOS SÃO BASEADOS NO SINAL DO TMS ($\delta=0$).

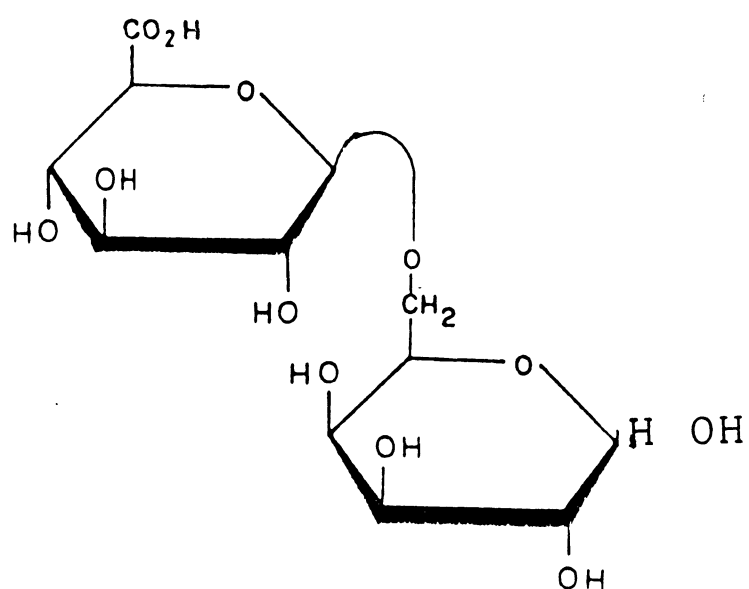


FIGURA V FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO ALDOBIURÔNICO
6-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL(ÁCIDO URÔNICO)-D-GALACTOSE

Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. - DEPT

Um estudo mais específico foi feito em torno do C-6 da galactose, que pelos estudos de ^{13}C -n.m.r. (Figura IV) demonstrou estar ligado por ligação (1→6) como discutido anteriormente. Para este estudo usou-se uma técnica de ^{13}C -n.m.r. denominada DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), mostrada na Figura VI (p.72), onde o grupamento CH_2OH (livre) ou CH_2 do CH_2OH (envolvido em ligação), aparece no espectro como um sinal que vem da linha de base para baixo e não para cima como costumeiramente observado. Na molécula do ácido aldobióurônico só há um grupo CH_2 , que corresponde ao grupo CH_2OH envolvido na ligação glicosídica. Este grupo quando está livre sinaliza em torno de δ 62.8 (56, 83, 90) (vide Figura VI) e este sinal "para baixo" não ocorre, porém ele surge em δ 71.5 sinal típico de CH_2OH ligado, (90) o qual tem um deslocamento para campo mais baixo, de aproximadamente δ 9.0. Isto comprova com certeza o envolvimento do C-6 da galactose numa ligação glicosídica neste dissacarídeo.

Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. -INVERSO

Através de um espectro de ^{13}C -n.m.r., do tipo inverso (H,X Correlation via ^1H detection), como mostrado na Figura VII, (p.73) observa-se a correlação dos sinais do espectro de próton

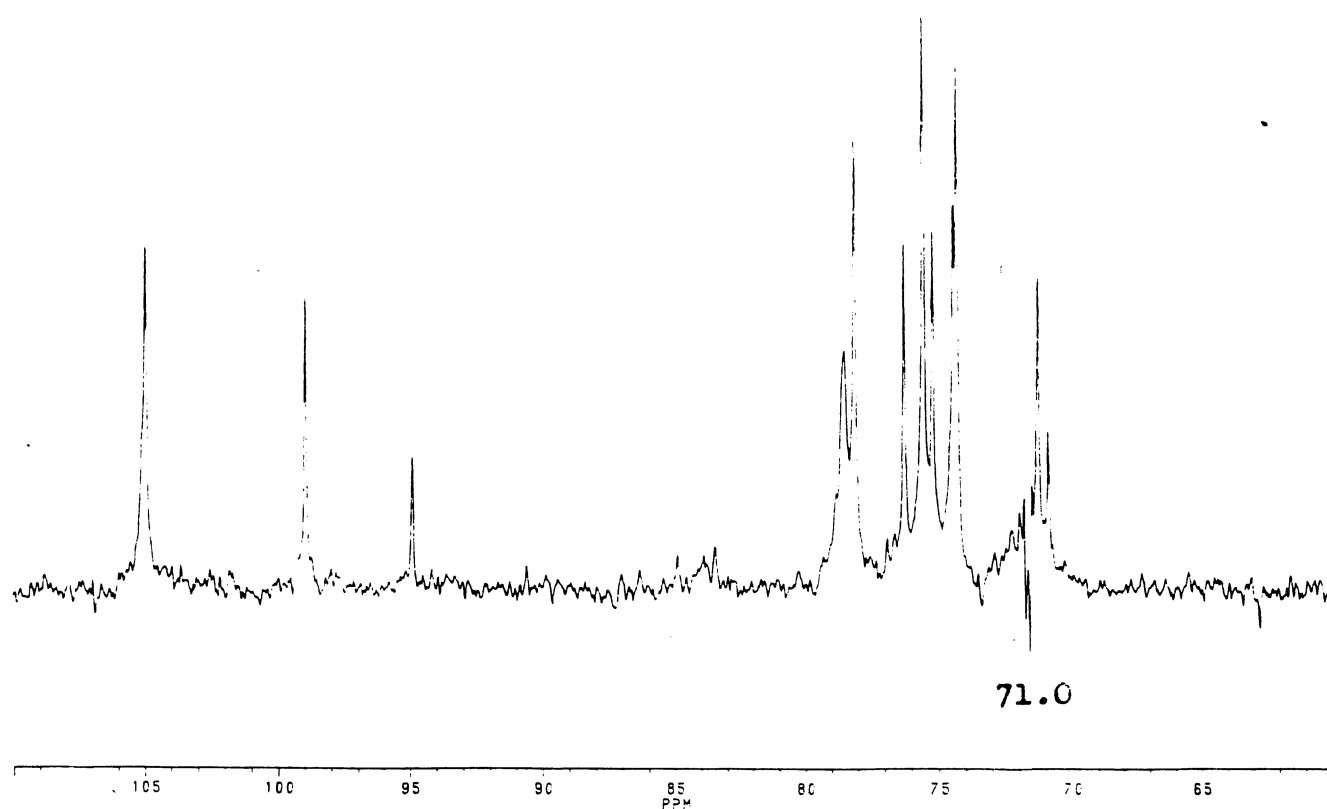


FIGURA VI ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DEPT DO ÁCIDO ALDOBIURÔNICO DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina. O SOLVENTE UTILIZADO FOI O D_2O E OS VALORES NUMÉRICOS SÃO BASEADOS NO TMS ($\delta=0$)

com o espectro de ^{13}C , ficando os sinais deste último na ordenada e os sinais de próton no eixo das abcissas. Portanto, o sinal de δ 4.5 correlaciona-se diretamente ao sinal de δ 104.5, o sinal de δ 4.55 ao de δ 98.9 correspondente à unidade de β -galactopirranose; finalmente observa-se que o sinal de δ 5.35 relaciona-se ao sinal de δ 94.8 correspondente à unidade de α -galactopirranose. Também podemos notar pelo INVERSO, a completa ausência do sinal de δ 62.8 correspondente ao CH_2OH e um certo número de sinais compreendidos entre δ 70 e δ 80 correspondentes ao C-2 a C-5 deste aldobiurônico.

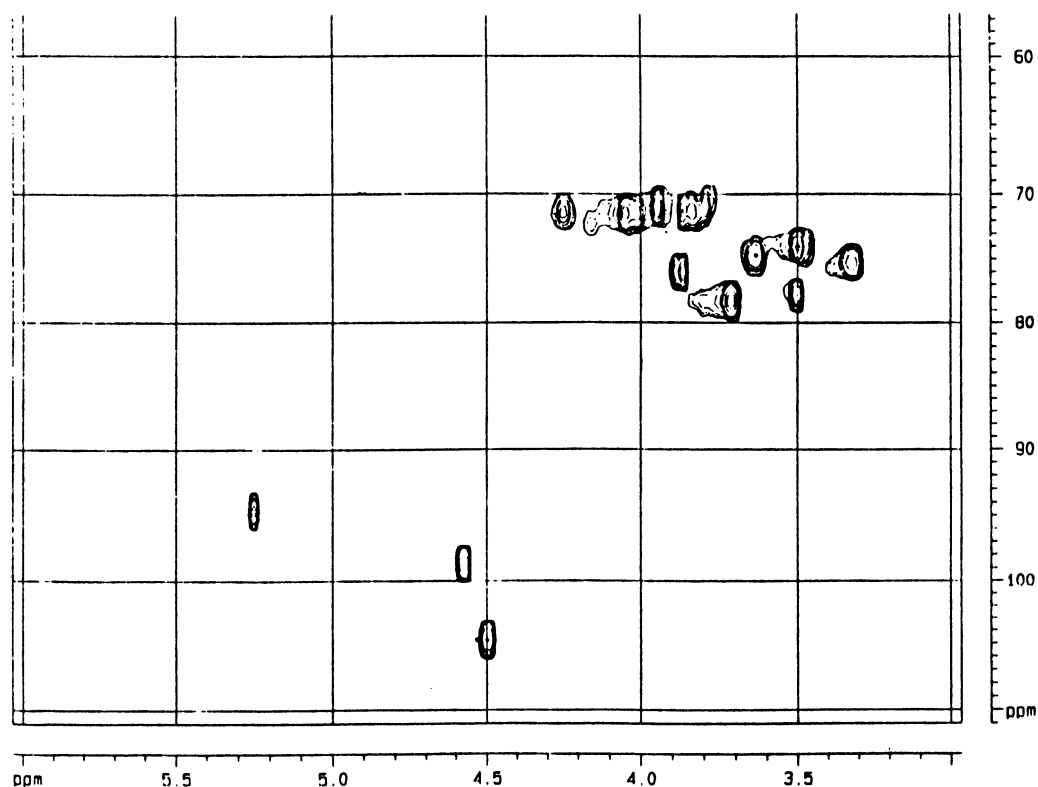
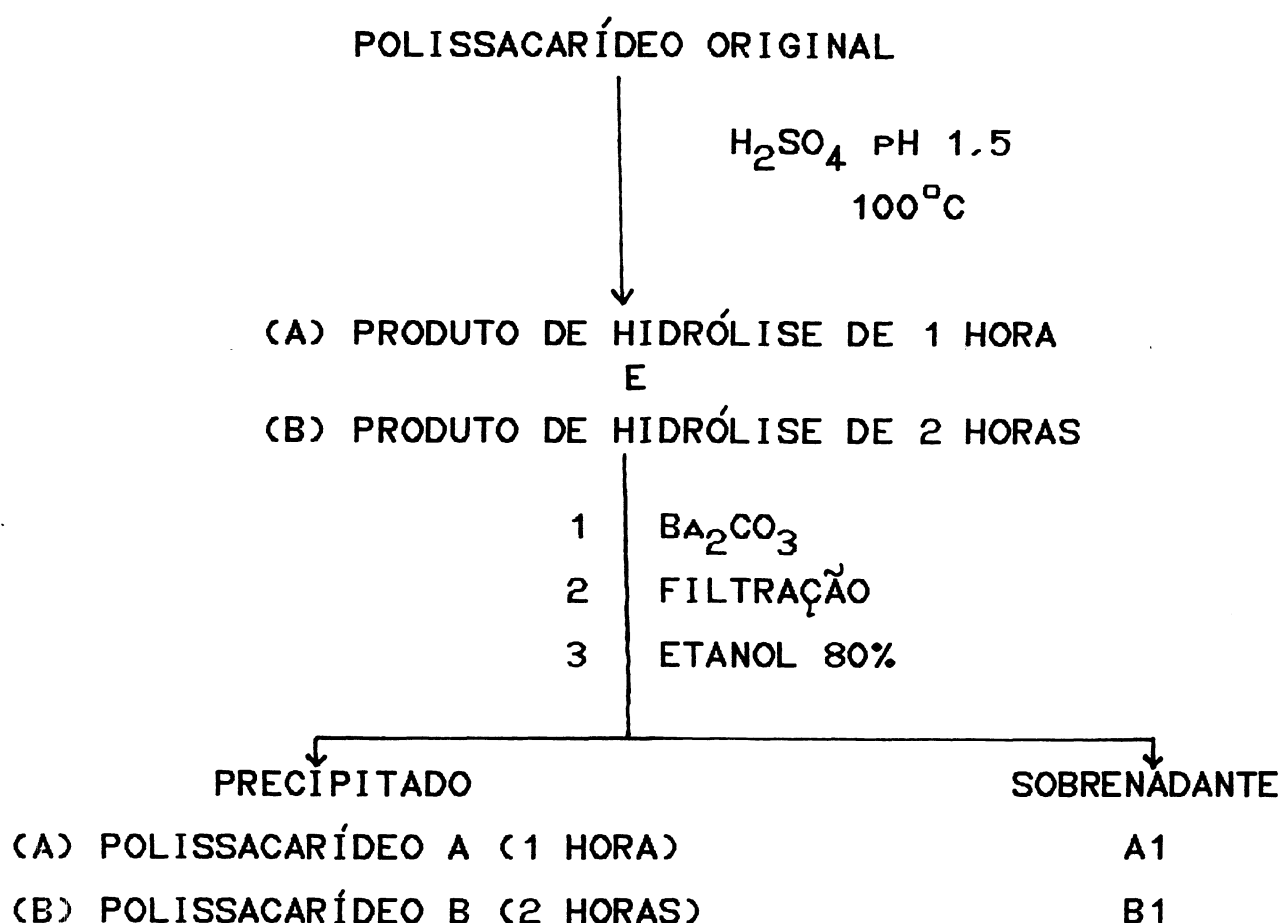


Figura VII

Espectro de ^{13}C -n.m.r. INVERSO, do ácido aldobiurônico do polissacarídeo de *Anadenanthera colubrina*. Os valores numéricos são baseados no TMS ($\delta=0$). O solvente utilizado foi o D_2O .

HIDRÓLISES ÁCIDAS PARCIAIS

O polissacarídeo original foi submetido à hidrólise ácida parcial (H_2SO_4 , pH 1.5 100°C), conforme Esquema III (p. 75), pelo período de uma e duas horas. Por esse processo foram produzidos dois polissacarídeos novos: aquele de uma hora (polissacarídeo A) e o de duas horas (polissacarídeo B). Estes polímeros após diálise, liofilização e filtração em gel, foram estudados por ^{13}C -n.m.r. e ^1H -n.m.r. e seus produtos de hidrólise ácida total, foram analisados por cromatografia em papel (c.p.) e g.l.c.-m.s.. Os resultados são mostrados na Tabela II (p.76), onde podemos observar as diferentes composições destes polissacarídeos, comparados à do polissacarídeo original. O polissacarídeo A, resultante da primeira hora de hidrólise apresenta-se com um conteúdo de arabinofuranose (33%), bem inferior ao do polissacarídeo original (64%), mostrando que com uma hora de hidrólise houve remoção de boa parte das unidades de arabinofuranose. Em contraposição, o percentual de galactose (20%) e de ramnose (6,0%) do polissacarídeo original sofreu considerável aumento - 46% e 8% respectivamente, o mesmo sucedendo com o percentual de ácido urônico, que passou de 10% no polissacarídeo original para 13% no polissacarídeo A obtido após uma hora de hidrólise. Estas modificações eram previstas, uma



ESQUEMA III PRODUÇÃO DO POLISSACARÍDEO A E B. A PARTIR DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina, POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE UMA E DUAS HORAS RESPECTIVAMENTE.

TABELA II COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS DOS POLISSACARÍDEOS ORIGINAL, A E B E DOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS DAS HIDRÓLISES ÁCIDAS PARCIAIS DE 1 E 2 HORAS (PH 1.5, 100°C, H₂SO₄).

MONOSSACARÍDEO	O	A	B	A1	B1
L-ARABINOSE	64% (71%)	33% (38%)	7% (8%)	97%	97%
D-GALACTOSE	20% (22%)	46% (53%)	75% (89%)	TRAÇOS	1%
L-RAMNOSE	6% (7%)	8% (9%)	2% (3%)	3%	2%
D-GLUCURÔNICO	10% (—)	13% (—)	16% (—)	—	—

O POLISSACARÍDEO ORIGINAL

A POLISSACARÍDEO A (1H)

B POLISSACARÍDEO B (2H)

A1 MONOSSACARÍDEOS LIBERADOS APÓS 1H DE HIDRÓLISE

B1 MONOSSACARÍDEOS LIBERADOS APÓS 2H DE HIDRÓLISE

vez que com o decréscimo do teor do monossacarídeo arabinose a tendência dos demais é a de um acréscimo, no sentido de compensar essa queda. No polissacarídeo B, da segunda hora, houve uma diminuição ainda mais acentuada do percentual da arabinose, que chegou a um valor residual de 7,0% e consequentemente um aumento significativo do teor da galactose (75,0%) e também do ácido urônico (16%). O conteúdo de ramnose ficou em 2%, de onde se supõe, que após a primeira hora de hidrólise, ficaram mais desprotegidas e foram removidas na segunda hora. Aliás, é fato surpreendente que parte da ramnose tenha resistido à hidrólise ácida parcial por duas horas.

Na Tabela II também podemos observar os valores entre parênteses, que se referem ao percentual de cada monossacarídeo, se desconsiderarmos o percentual de ácido urônico, de modo que na segunda hora ficaríamos praticamente com uma galactana (89% de galactose, 8% de arabinose e 3% de ramnose).

O sobrenadante etanólico A1, proveniente da precipitação alcoólica utilizada para precipitar o polissacarídeo A, após sofrer hidrólise ácida total e ser levado à forma de alditol acetato, mostra que a arabinose é quase que o componente exclusivo (97%), aparecendo apenas traços de galactose e um pouco de ramnose (3%). No sobrenadante etanólico B1 aparece galactose (1%) e ramnose (2%). Pela análise dos monossacarídeos nos sobrenadantes etanólicos, pode-se concluir que o método empregado foi altamente eficiente, já que a finalidade do mesmo era a de remover as unidades furanosídicas e não as

piranosídicas; tal objetivo foi alcançado, como pode ser observado na Tabela II (p.76), (coluna B1) que mostra apenas 1% de galactose hidrolisada.

Neste ponto já podemos deduzir que o polissacarídeo é uma arabinogalactana, onde existe um núcleo de galactopiranoses com ramificações de moléculas de arabinofuranoses. Estas últimas localizadas mais externamente e apresentando ligações glicosídicas muito lábeis, são prontamente removidas por hidrólise ácida branda. Isto ocorre de tal forma que após duas horas de hidrólise obtém-se praticamente uma galactana (75% de Gal considerando o ácido urônico, ou 89% descontado este último). Pode-se também afirmar que a cadeia principal de galactoses não foi atingida, como será discutido na análise do espectro de ^{13}C -n.m.r. a seguir; um resultado muito bom, mostrando mais uma vez a eficiência da hidrólise ácida parcial realizada que removeu apenas as unidades de arabinofuranose.

Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. e de ^1H - do polissacarídeo A

Pela análise do espectro de ^{13}C -n.m.r., observa-se que não há sinais da presença de açúcar redutor na região de δ 94 a 98, aproximadamente, como pode ser observado na Figura VIII (p. 79), indicando que não houve quebra na cadeia principal ou a formação de fragmentos não dialisáveis. Quanto aos demais sinais de ^{13}C -n.m.r., do polissacarídeo A, o que se pode observar é que na região de C-1, os sinais de δ 111.0, δ 110.2 e

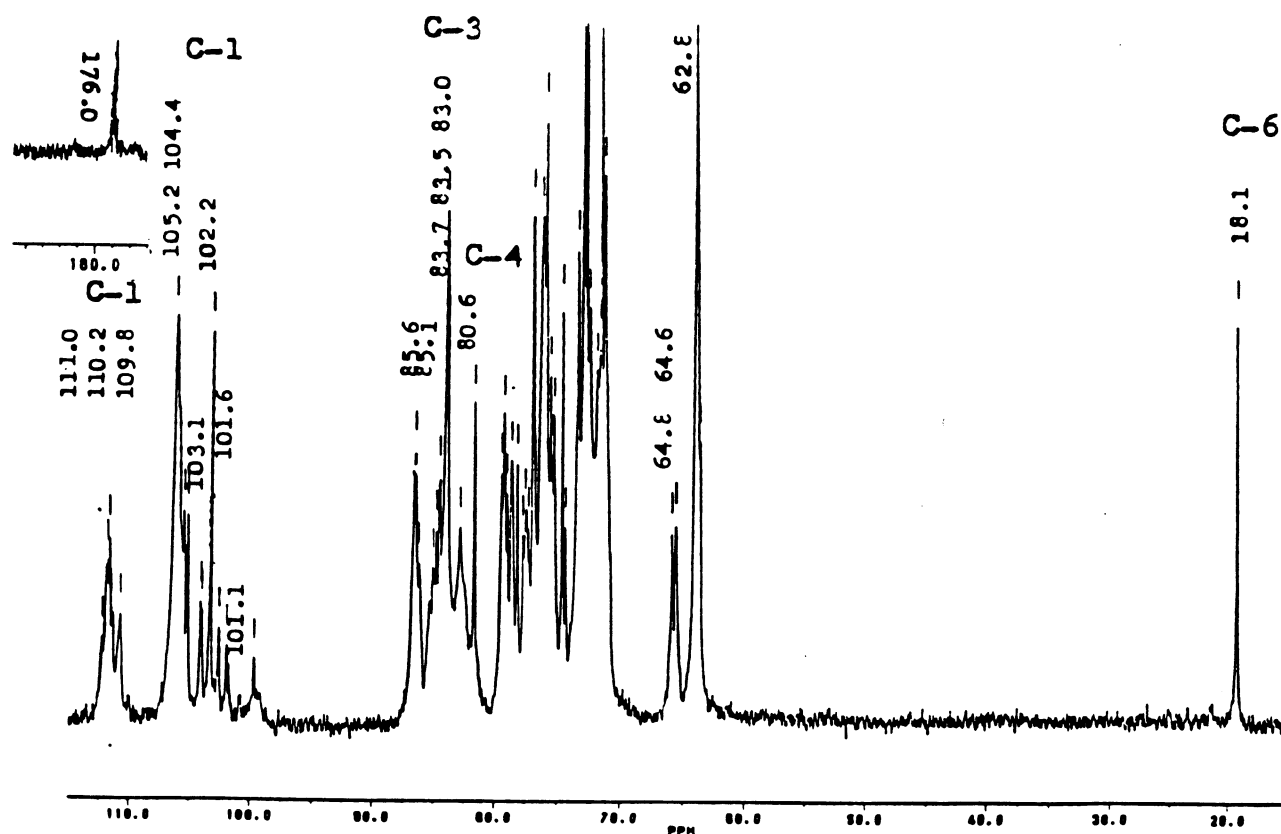


FIGURA VIII ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DO POLISSACARÍDEO. A OBTIDO APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (100°C - 1h) DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina EM D_2O A 40°C . OS VALORES NUMÉRICOS SÃO BASEADOS NO SINAL DO TMS ($\delta=0$).

109.8 do polissacarídeo original, (Figura I, p.59) referentes ao C-1 das unidades de arabinofuranoses, conforme discutido anteriormente, sofreram uma modificação, no sentido de uma simplificação desta região, apesar de manter os mesmos sinais, mostrando que parte destas unidades foram removidas, ou seja- os sinais estão com intensidade menor em relação aos demais sinais desta região e em relação ao polímero original. Os sinais de C-4 da arabinofuranose também simplificaram-se, aparecendo quase que apenas um sinal, de δ 85.6, pois o sinal de δ 85.1 diminuiu bastante em intensidade. Na região de CH_2OH livres das arabinofuranoses (C-5) os sinais de δ 64.8 e δ 64.6, correspondentes a estas unidades, mostraram-se bastante diminuídos em área total quando comparados aos do original, e o de δ 64.3 desapareceu. Isto reforça a impressão de que as unidades de arabinofuranoses estariam sendo removidas, comprovando os dados de g.l.c-m.s., discutidos anteriormente, para o sobrenadante etanólico A1. Note-se ainda, que na região C-1 houve uma diminuição generalizada dos sinais, o que é compatível com uma molécula que perdeu parte das unidades, provavelmente ramificantes, de arabinofuranose. O sinal de δ 83.0, como discutido no polímero original, permanece, pois faz parte dos sinais das galactopiranoses 3-O substituídas, bem como o sinal referente ao C-6 desta mesma unidade; mais especificamente o CH_2OH livre que sinaliza em δ 62.8, concordando com o conteúdo deste monossacarídeo no polissacarídeo A, como mostra a Tabela II (p.76). O sinal de CH_3 correspondente

ao C-6 da ramnose, surge em δ 18.1, bem como o de δ 101.6 do C-1 deste monossacarídeo (38), em concordância com o g.l.c.-m.s. do polissacarídeo A, demonstrando que a hidrólise ácida parcial não removeu este açúcar. Os sinais de δ 105.2 e 104.4, correspondentes às unidades de β -D-Galp e ao C-1 do ácido urônico respectivamente, também permanecem, bem como os de δ 103.1, 102.2 e 101.1 discutidos anteriormente. O espectro de ^{13}C -n.m.r. DEPT, do polissacarídeo A (Figura IX p. 82) torna bem evidente os sinais de CH_2 correspondentes ao C-6 de galactopirranose e C-5 de arabinofuranose que não estão envolvidos em ligação glicosídica, em δ 62.8, 64.8 e 64.6, respectivamente, bem como o sinal de δ 71.0 correspondente ao C-6 da galactopirranose ligada glicosidicamente, que desloca o sinal em aproximadamente δ 9.0 para campo mais baixo (3). Todos da linha de base para baixo, como é característico da técnica.

Quanto ao espectro de próton do polissacarídeo A (Figura X, p. 83), observamos o aparecimento do H-6, do grupo desoxi da ramnose, em δ 1.3 enquanto que o H-1 situa-se em δ 4.95 correspondentes ambos portanto à unidade de α -L-ramnopirranose (38). O H-1 da β -D-galactopirranose situado em δ 4,5, está de acordo com as literaturas consultadas (3, 48) e confirmando a anomericidade β desta unidade. O H-1 das unidades de arabinofuranoses situam-se em campo mais baixo (δ 5.3), indicando uma anomericidade alfa, que está de acordo com os valores encontrados por Saulnier et al. (87).

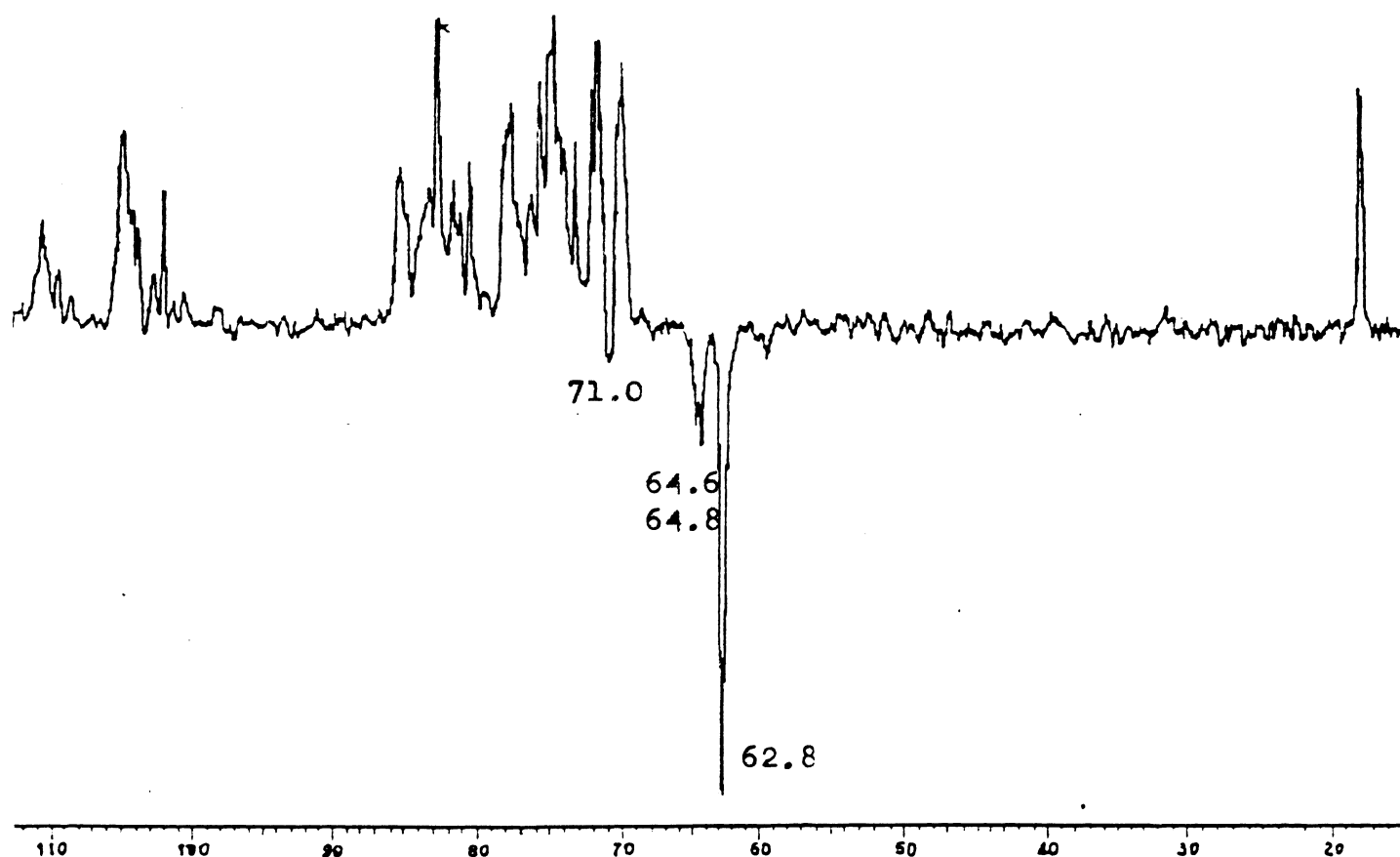


FIGURA IX ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DEPT DO POLISSACARÍDEO A, OBTIDO APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL (1H). O SOLVENTE UTILIZADO FOI O D_2O E OS VALORES NUMÉRICOS SÃO BASEADOS NOS SINAIS DO TMS ($\delta=0$).

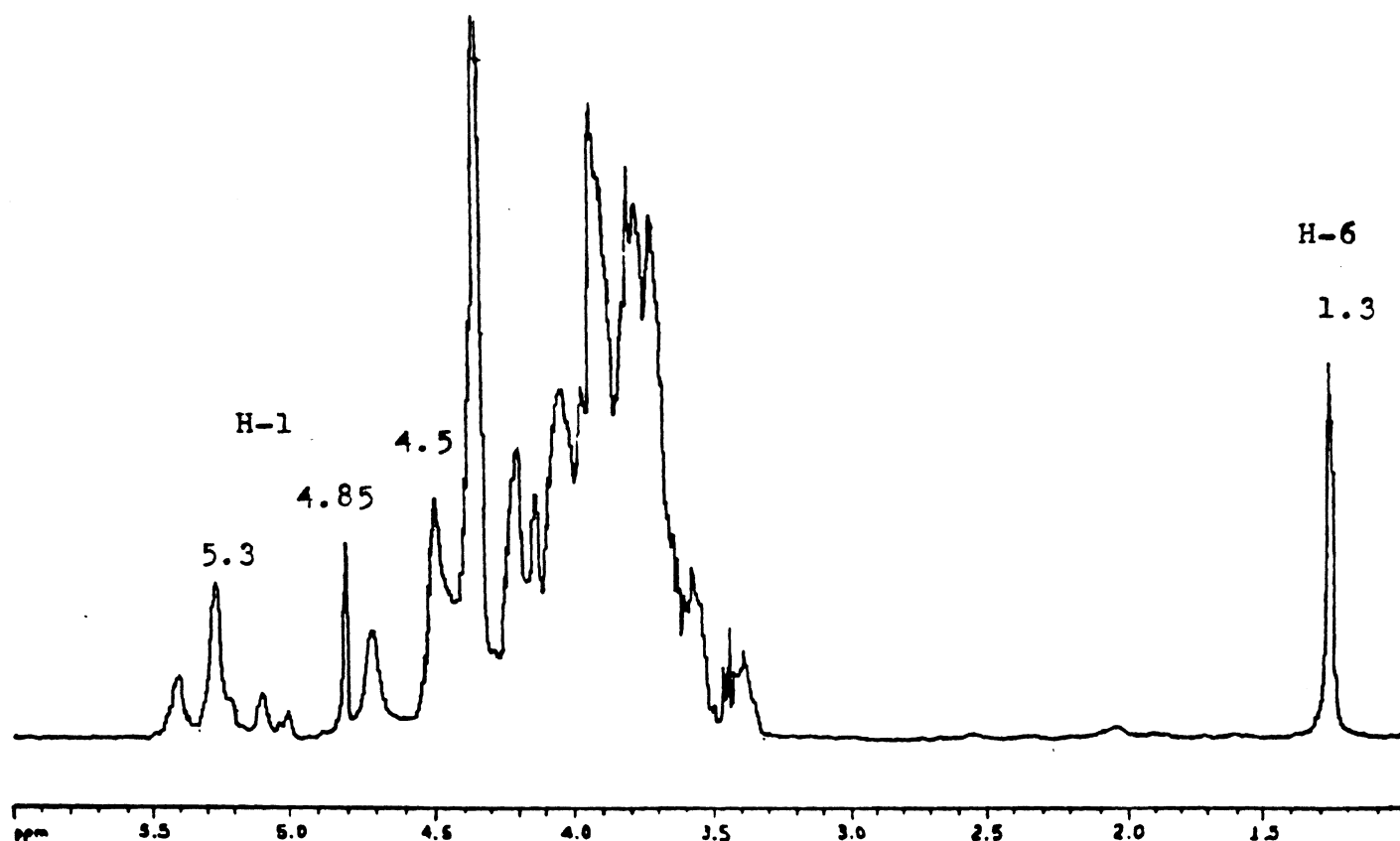


FIGURA X ESPECTRO DE ^1H -N.M.R. DO POLISSACARÍDEO A (OBTIDO APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE 1H). O SOLVENTE UTILIZADO FOI O D_2O E OS SINAIS SÃO BASEADOS NOS VALORES DO TMS ($\delta=0$).

Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. e ^1H do polissacarídeo B

O polissacarídeo B, obtido da segunda hora de hidrólise torna o que foi discutido no polissacarídeo A bem mais evidente. De uma maneira geral, observa-se como anteriormente, uma simplificação do espectro (Figura XI, p.85), em termos de número de sinais. Especificamente, observa-se que a região de C-1 mostra-se nitidamente mais limpa. Aparecem apenas os sinais de δ 105.2 e um de δ 104.8, atribuídos ao C-1 de galactopiranoses 3-O substituídas. O sinal de δ 104.4 atribuído ao C-1 do ácido urônico também se mantém. Na região de ligação, ocorrem bastante diminuídos em intensidade, o sinal de C-4 da arabinofuranose em δ 85.1 confirmando os 7% do g.l.c.-m.s. O sinal de δ 83.0 correspondente ao C-3 da galactopiranosose (37, 44, 83) foi mantido e embora apareça menor, mostra-se bem mais largo (fato observado em outras galactanas também), sendo também compatível com o g.l.c. (Tabela II). Na região de CH_2OH , os sinais do C-5 da arabinofuranose de δ 64.3 e δ 64.6 foram excluídos do espectro, mais uma vez evidenciando que o polissacarídeo B, produto da segunda hora de hidrólise, tem muito pouco do açúcar arabinofuranose. Quanto ao sinal de CH_3 da ramnopiranosose, ainda percebe-se o seu aparecimento, porém bem mais discretamente, em concordância com os dados do g.l.c. onde o teor de ramnose é de apenas 2%. Um outro sinal, de δ 80.6 que apareceu também nos espectros do polissacarídeo original e A, pode ser do ácido urônico 4-O

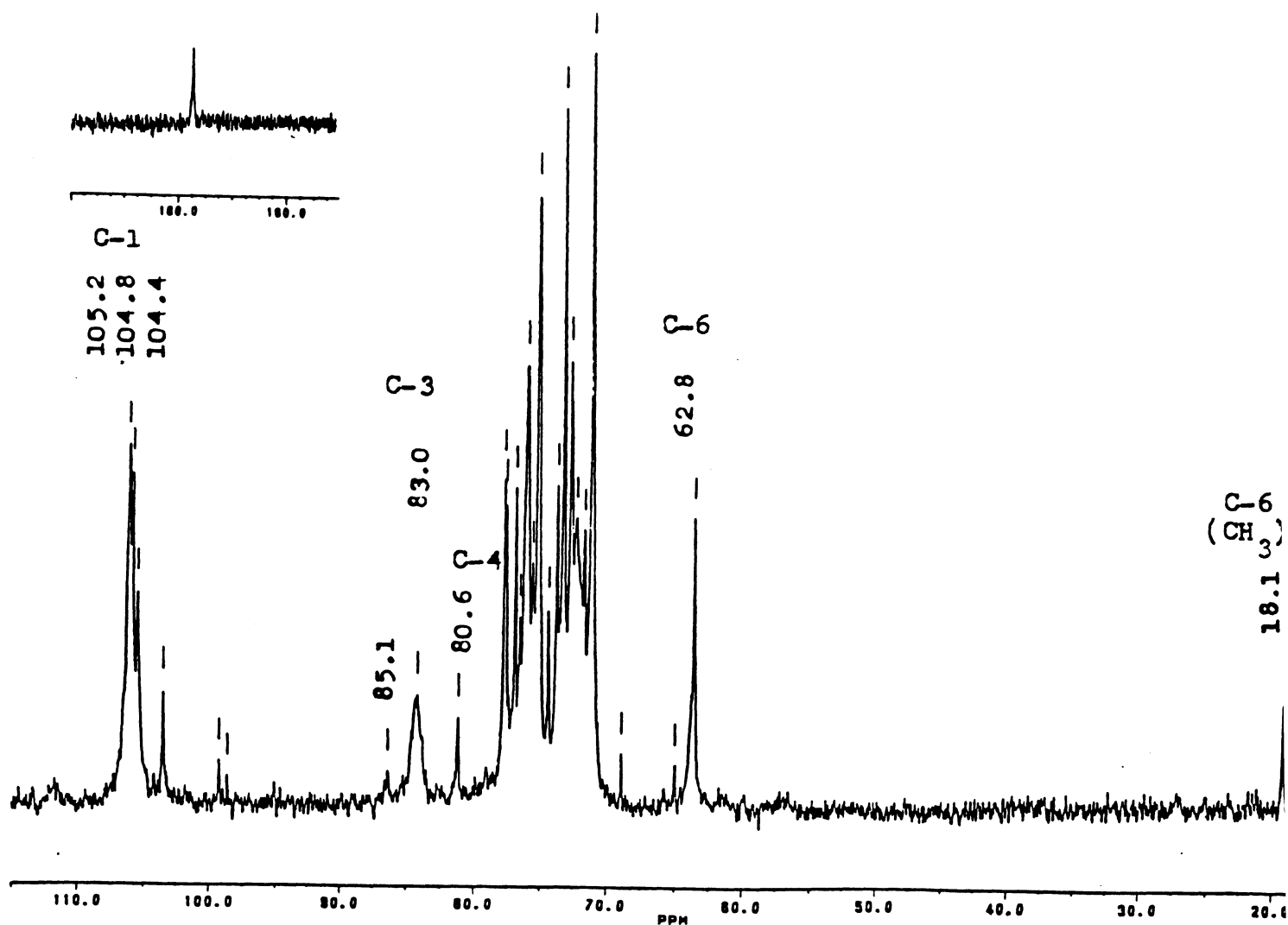


FIGURA XI ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DO POLISSACARÍDEO B, OBTIDO APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (2H) DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE *Anadenanthera colubrina* EM D_2O A 30°C . OS VALORES NUMÉRICOS SÃO BASEADOS NO TMS ($\delta=0$).

substituído, segundo a literatura (44). Ele aumenta no polissacarídeo A (que tem um conteúdo de ácido urônico que sobe de 10% do polissacarídeo original para 13%) e diminui no polissacarídeo B, onde o teor de ramnose cai para apenas 2%, o que leva a crer que o ácido urônico (ou parte dele) possa estar 4-O-substituído pela ramnose, pois a ramnose sendo eliminada do polímero, faz com que o sinal de δ 80.6 também tenha a sua intensidade diminuída, e é isto que se verifica. O ácido urônico se evidencia ainda, pelo sinal de C-6 (δ 176).

É interessante notar que em δ 94 e δ 98, onde apareceriam os sinais de unidades terminais redutoras, α e β respectivamente, como prévia e rapidamente discutido, nada se evidencia, comprovando que não houve quebra das ligações glicosídicas das galactopiranoses na cadeia principal do polímero.

Ao reunirmos todas essas informações, a hipótese de termos um polímero constituído de moléculas de galactopiranoses, ligadas provavelmente em O-3, fica praticamente comprovada, polímero este que seria também formado por unidades ramificadas de arabinofuranose. Quanto às unidades de ramnose, baseando-se na literatura, pode-se afirmar que estejam mais expostas (44, 83, 98), tendo sido quase que totalmente removidas com estas hidrólises brandas. O sinal de δ 18.1 ainda aparece representando os 2% encontrados. A Figura XII (p.87) mostra os polissacarídeos original A e B juntos, facilitando a comparação.

Estes resultados são reforçados por aqueles de ^1H , onde

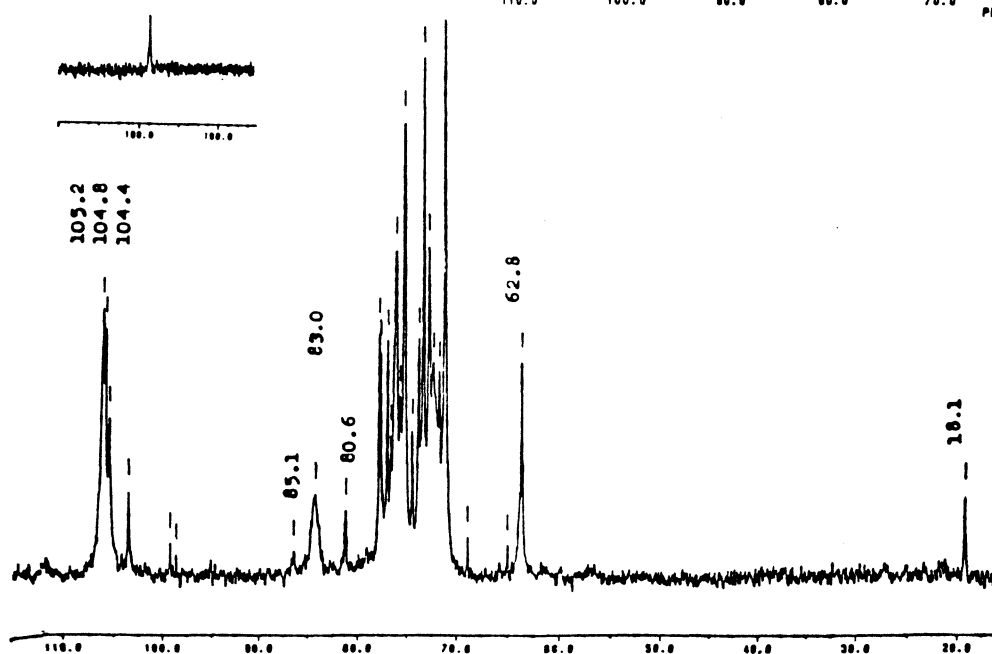
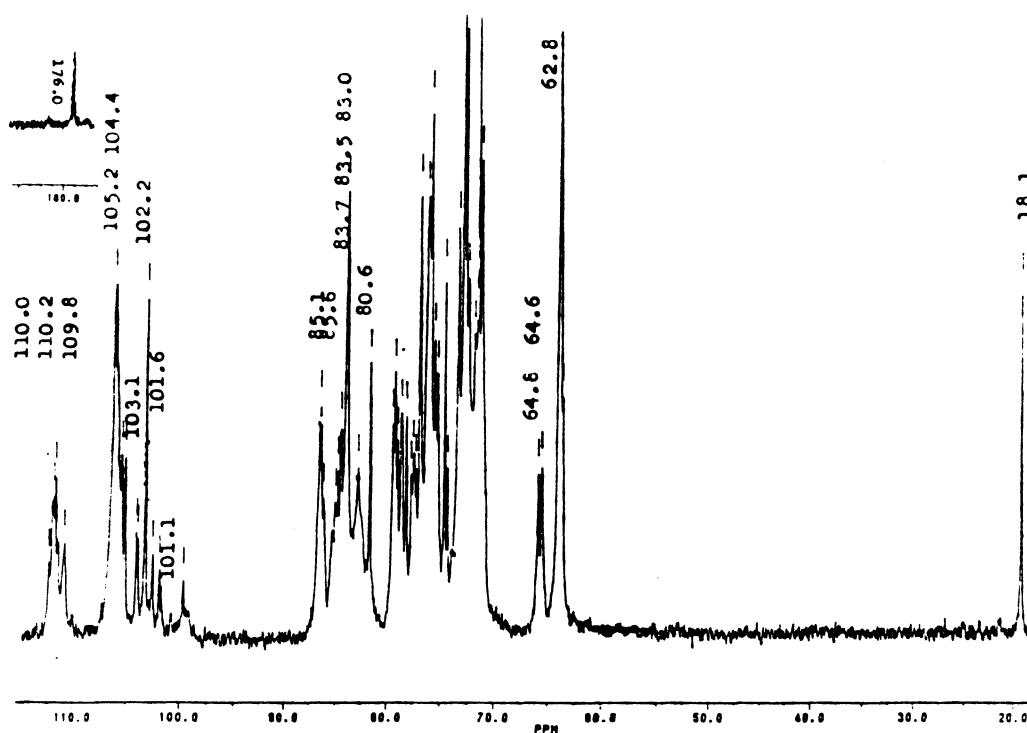
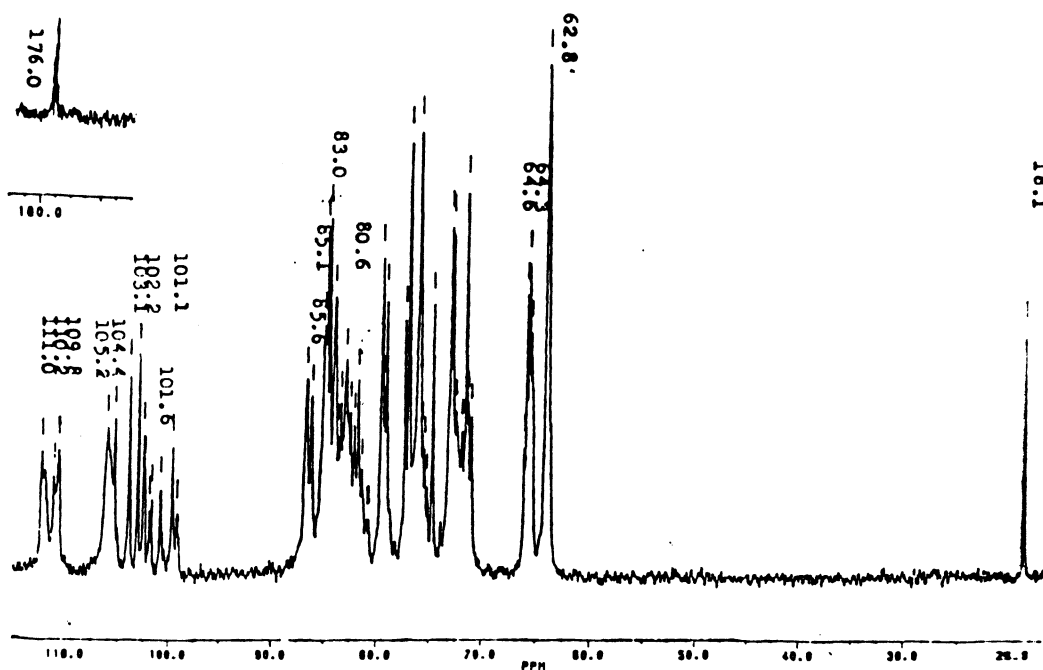


FIGURA XII

ESPECTROS DE
 ^{13}C -N.M.R. DOS
 POLISSACARÍDEOS
 ORIGINAL, A E B

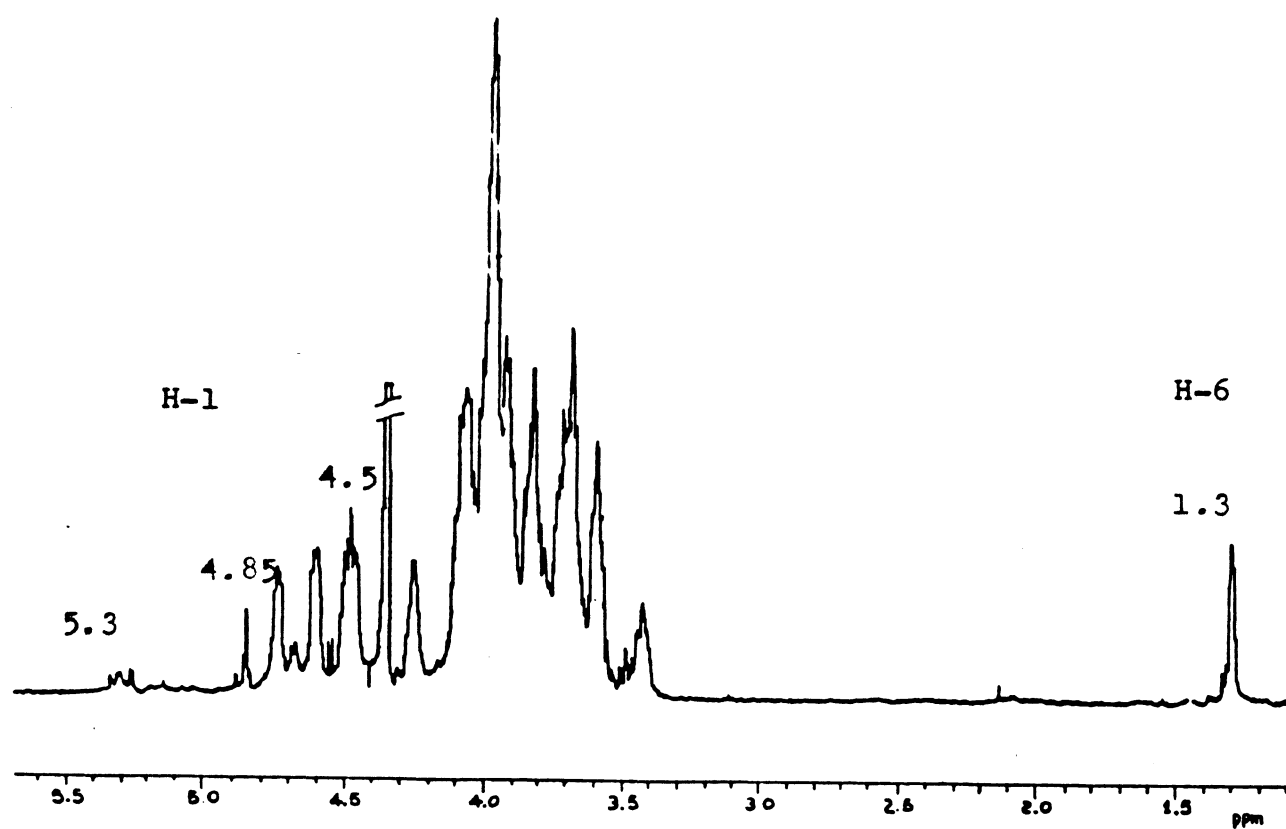


FIGURA XIII ESPECTRO DE ^1H -N.M.R. DO POLISSACARÍDEO B (OBTIDO APÓS 2H DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL). O SOLVENTE UTILIZADO FOI O D_2O E OS SINAIS SÃO BASEADOS NOS VALORES DO TMS ($\delta=0$).

observamos, na Figura XIII (p.88), o sinal de δ 1.3 correspondente ao CH_3 e em campo mais baixo o de δ 4.85 referentes à unidade de α -L-ramnopirranose, enquanto que em δ 4.5 aquele correspondente à β -galactopirranose. Os sinais em campo baixo, correspondentes às unidades de α -arabinofuranose encontram-se praticamente ausentes. Por esta Figura XIII também podemos afirmar que neste polímero (polissacarídeo B) não encontramos unidades de α -D-galactopirranose, pois se as mesmas existissem nesta molécula, deveriam aparecer em aproximadamente δ 5.15 (61).

Conteúdo de ácido urônico dos polissacarídeos A e B

Em relação à dosagem do ácido urônico, dados bastante atrativos são mostrados pela Tabela II, em que os percentuais obtidos para o polissacarídeo A (13%) e o polissacarídeo B (16%) estão aumentados. Este aumento era esperado, pois com a remoção das unidades de arabinofuranose nas hidrólises ácidas parciais, o peso molecular do polímero cai consideravelmente. Essa elevação do conteúdo de ácido urônico também sugere que estas unidades estejam ligadas a outras unidades piranosídicas e não furanosídicas, decorrendo disso a sua resistência à hidrólise de duas horas em pH 1.5. Se o ácido urônico estivesse ligado à arabinose furanosídica, o resultado seria a liberação de um aldobiurônico do tipo ácido glucurônico-arabinose que seria encontrado no sobrenadante etanólico A1 e ou B1, resultantes da

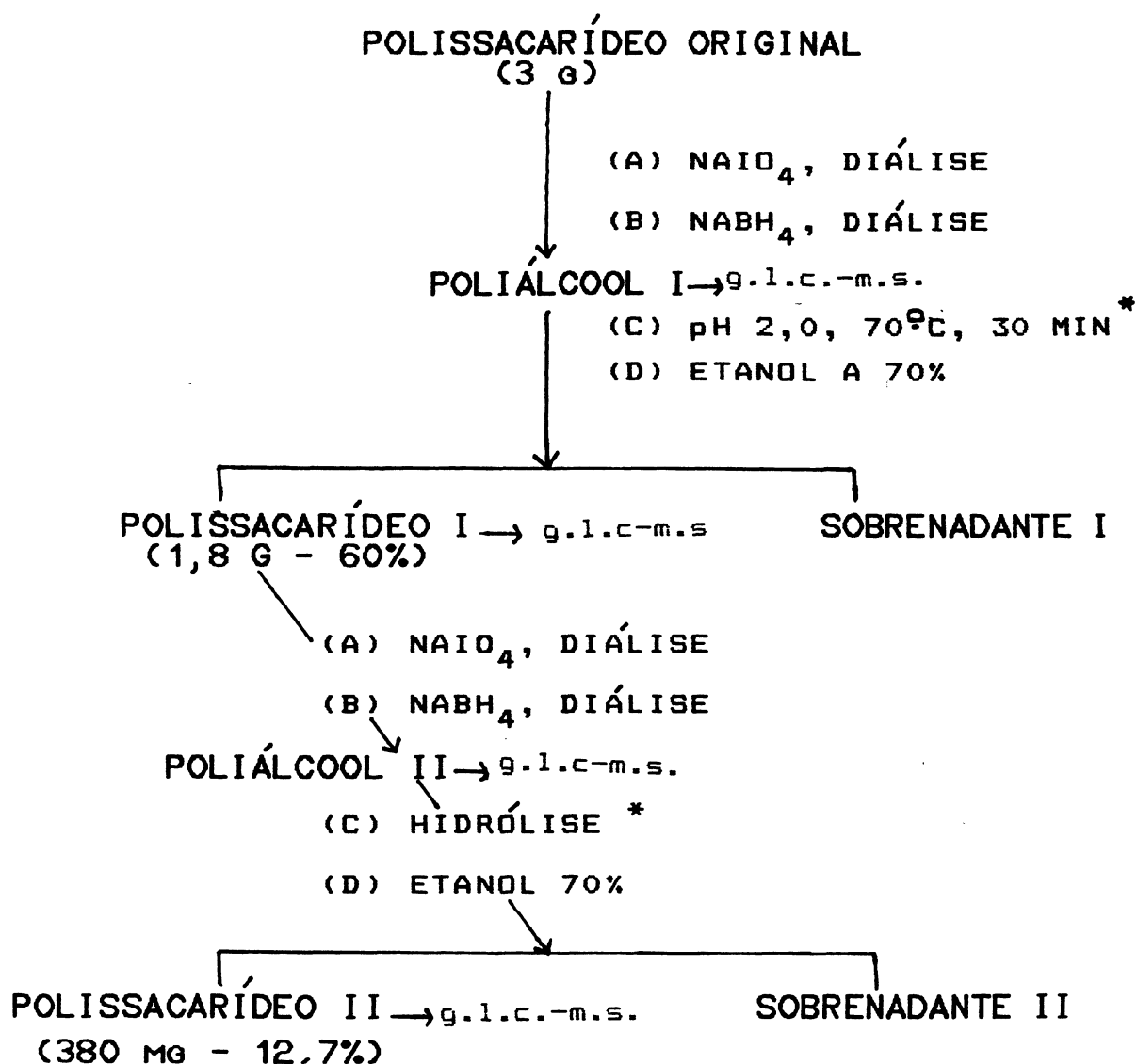
precipitação etanólica dos polissacarídeos hidrolisados, fato que não ocorreu, quando da realização da cromatografia em papel do sobrenadante etanólico A1 e B1. Na verdade, parece que até agora, nunca se isolou este ácido aldobiurônico de um exsudato, sendo que em *Citrus limonia* (98) chegou-se a um dissacarídeo em que o ácido urônico estava ligado à arabinose, mas piranosídica. Também não foi encontrado ácido glucurônico livre (cromatografia em papel do sobrenadante A1 e B1), mostrando que esta unidade ácida permanece retida no polissacarídeo residual A e B. Tal fato foi comprovado pela dosagem do ácido urônico, nos polissacarídeos citados, onde o percentual de 10% do polissacarídeo original passa a 13% após uma hora de hidrólise e a 16% após duas horas de hidrólise, como exposto anteriormente. Sendo assim, depois de duas horas de hidrólise obtemos um polímero com grupos ácidos em aproximadamente 1/5 da macromolécula.

DEGRADAÇÕES SEQUENCIADAS DE SMITH

As degradações sequenciadas de Smith foram realizadas com o objetivo de esclarecer a susceptibilidade do polissacarídeo em estudo ao periodato, ou seja, verificar se o polímero é altamente ramificado, bem como, observar a presença de unidades 3-O substituídas, que não permitiriam a oxidação pelo periodato ou de outros tipos de ligações que ao contrário, levariam a molécula a uma degradação total.

Com esse intento, foram realizadas duas degradações sequenciadas do tipo Smith, através dos procedimentos mostrados no Esquema IV (p.92).

Após cada degradação, realizou-se estudos químicos dos polissacarídeos residuais (polissacarídeos I e II) e dos poliálcoois, chamados também de I e II conforme mostra a Tabela III (p.93), onde observa-se que o poliálcool I apresenta um alto teor de glicerol (39%), o que significa que o polímero original é de fato ramificado e que as unidades de arabinofuranose são terminais (28% de extremidades terminais não redutoras) e também estão ligadas glicosidicamente por (1→5) (o que se confirma pela presença do derivado 2,3,5-Me₃-Ara no polissacarídeo original). Isto porque se as unidades de arabinofuranoses fossem 2-O ou 3-O substituídas, estas não teriam sofrido degradação pelo periodato. Pode-se



ESQUEMA IV OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS I E II, ATRAVÉS DA PRIMEIRA E SEGUNDA DEGRADAÇÕES SEQUENCIADAS DE SMITH, DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina. ENTRE PARÊNTESES ESTÃO OS PESOS E OS RENDIMENTOS.

TABELA III COMPOSIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS I E II, OBTIDOS POR UMA E DUAS DEGRADAÇÕES DE SMITH DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina RESPECTIVAMENTE BEM COMO DOS POLIÁLCOOIS CORRESPONDENTES.

	SMITH I POLIÁLCOOL I	POLIS. RESIDUAL I POLISSACARÍDEO I	SMITH II POLIÁLCOOL II	POL. RES II POLISSAC. II
GLICEROL	39%	—	33%	—
MITRITOL	1%	—	—	—
RABINOSE	24%	41%	5%	6%
ALACTOSE	36%	59%	62%	94%

também concluir, em função do teor de arabinose encontrado (24.%) no polissacarídeo I que existem unidades de arabinofuranose substituídas em 2 ou em 3, resistentes portanto, ao periodato. Estes resultados estão em concordância com os resultados de metilação do polissacarídeo original, no qual observa-se a presença do 2-Me-Ara, 2,5-Me₂-Ara e do 3,5-Me₂-Ara. Assim sendo, os 39% de glicerol derivam das extremidades não redutoras de arabinofuranose (28%), das unidades de arabinofuranose 5-O substituídas (5%) e também das extremidades não redutoras de galactose (2%) e ainda das unidades de galactopiranoses 6-O-substituídas (3%) num total de 38%.

Espectroscopia de ¹³C-n.m.r. do polissacarídeo I

Os resultados acima discutidos, podem ser reforçados pela análise do espectro de ¹³C-n.m.r. do polissacarídeo obtido pela primeira degradação de Smith (polissacarídeo I) na Figura XIV (p.95), onde observa-se que dos sinais correspondentes às unidades furanosídicas permaneceu o de δ 110.9, (nos espectros anteriores apareceu em δ 111.0), que é provavelmente de extremidades não redutoras, que se formaram depois da oxidação de unidades de arabinose terminais as quais substituíam outras unidades em 2 ou 3, ou seja, estas últimas passaram a ser terminais. O sinal de δ 110.7, é então provavelmente correspondente às unidades de arabinofuranoses

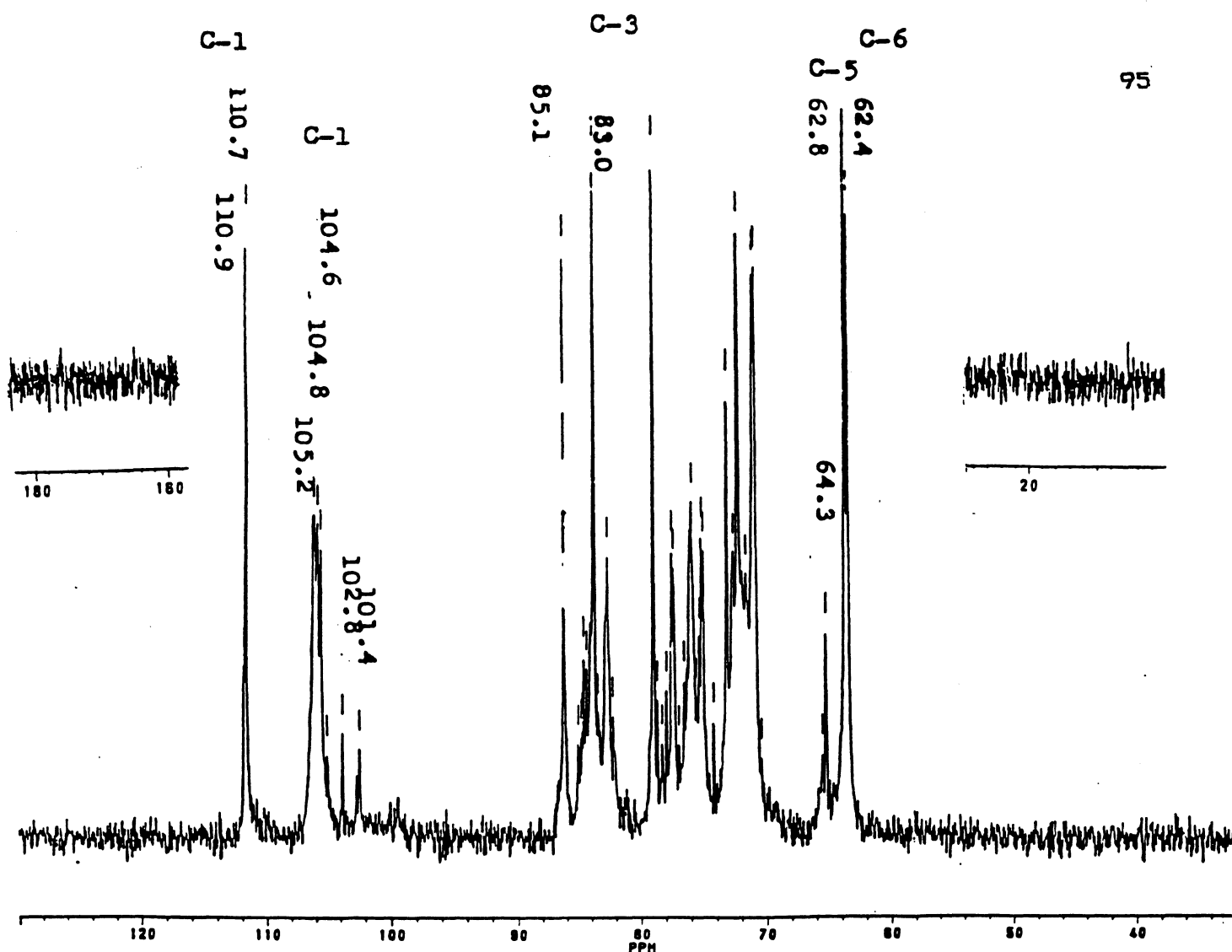


FIGURA XIV ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DO POLISSACARÍDEO I, OBTIDO APÓS UMA DEGRADAÇÃO DE SMITH DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL, DE Anadenanthera colubrina. O SOLVENTE UTILIZADO FOI O D_2O , A 50°C . OS SINAIS SÃO BASEADOS NO VALOR DO TMS ($\delta=0$).

2-O ou 3-O substituídas, uma vez que estas substituições tornam a molécula resistente ao periodato. Os demais sinais foram eliminados do espectro porque eram correspondentes às unidades de arabinofuranose que foram degradadas, demonstrando-se com isto termos diversos tipos de ramificações das unidades de arabinofuranoses. O sinal correspondente ao C-1 das galactoses beta piranosídicas de δ 105.2 permanece e surgem ainda os sinais de δ 104.8 e de 104.6 que são sinais típicos das unidades de galactopiranoses 3-O substituídas (33,37,44,83). Na região de C-6 de unidades piranosídicas, observam-se os sinais de δ 62.4 e δ 62.8, indicando que há pelo menos dois tipos de ligação para a galactose e que estes sinais após a primeira degradação Smith, da qual resultou o polissacarídeo I, estão pouco mais intensos, quando comparados ao polissacarídeo original. Isto indica que, provavelmente algumas unidades de arabinofuranose que foram removidas pela oxidação estavam ligadas no C-6 da cadeia principal de galactopiranoses. Os sinais presentes em δ 101.4 e 102.8 ainda não podem ser esclarecidos, já que as unidades de ramnpiranose e de GlcpA foram removidos durante o processo de oxidação pelo periodato, indicando com isto que os mesmos são susceptíveis a este processo de oxidação; o que se confirma pelo desaparecimento dos sinais característicos em δ 18.1 (56) correspondente ao CH_3 da ramnpiranose e de δ 176, correspondente ao $-\text{COOH}$ do ácido glucurônico (83). As unidades de ramnpiranose são portanto terminais e isto foi comprovado também pela presença do

derivado 2,3,4-Me₃-Ram. A molécula de ácido glucurônico é também terminal ou então está bloqueada em C-2 ou C-4, porém jamais em C-3 (estes resultados não foram esclarecidos pela metilação). É mais provável que seja em C-4, pois dados da literatura mostram que o mesmo frequentemente ocorre como terminal não redutor ou O-4 substituído, como discutido anteriormente. A hipótese de que o sinal de δ 80.6 seja do C-4 substituído do ácido urônico é reforçada aqui, pois ele não se faz presente neste espectro. Voltando a atenção para a arabinofuranose, percebemos que o sinal de δ 64.3, de C-5 livre, permaneceu após a primeira degradação de Smith, porém é pouco intenso quando comparado àquele correspondente ao sinal de C-1 de δ 110.9 ou ao de C-4 de δ 85.1 e isso talvez indique que as unidades de α -L-arabinofuranose ainda estão bloqueadas em C-5 e com ramificações em C-2, o que pode ser esclarecido talvez, pela segunda degradação de Smith. O polissacarídeo I, obtido da primeira degradação de Smith com um rendimento de 60%, em relação ao original, foi novamente oxidado, segundo o Esquema IV (p. 92) obtendo-se o polissacarídeo II com rendimento em peso de 21.%, em relação ao polissacarídeo I, (e por consequência de 12,7% em relação ao original), apresentando um alto percentual de galactose (94 %) e 6% de arabinose.

Espectroscopia de ¹³C-n.m.r. do polissacarídeo II

Pode-se observar claramente na Figura XV (p.98), que

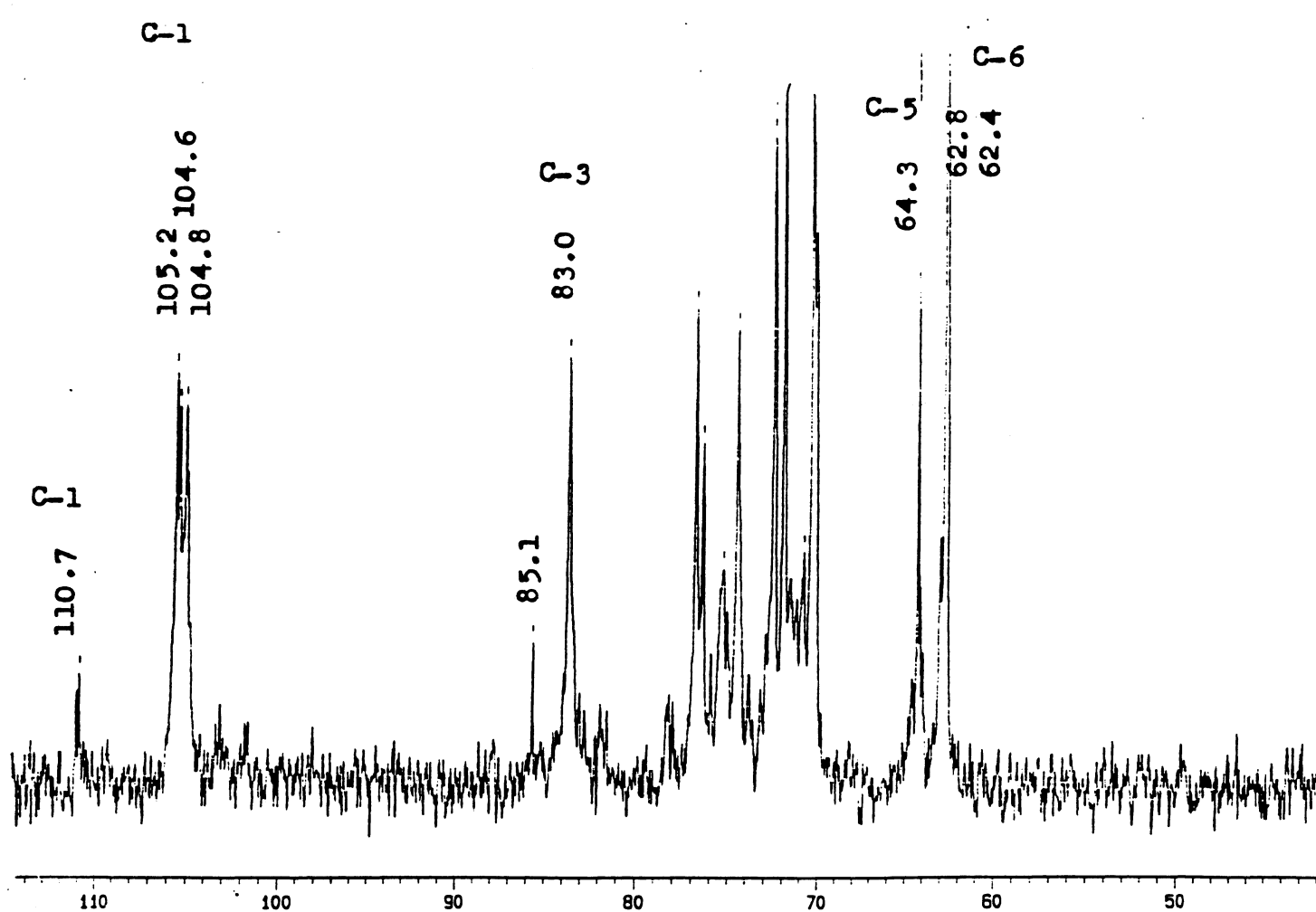


FIGURA XV ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DO POLISSACARÍDEO II, OBTIDO APÓS DUAS DEGRADAÇÕES DE SMITH DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina. O SOLVENTE UTILIZADO FOI O D_2O , A 50°C . OS VALORES NUMÉRICOS SÃO BASEADOS NO SINAL DO TMS ($\delta=0$).

representa o espectro de ^{13}C -n.m.r. do produto da segunda degradação de Smith, a presença de arabinofuranose em δ 110.7, porém, em menor percentual quando comparado ao espectro da primeira degradação e ao do polissacarídeo original, o mesmo ocorrendo com o sinal de C-4 em δ 85.1 (37, 44, 56, 83). A presença destes sinais mostra que algumas unidades de arabinose ainda resistem à segunda degradação de Smith, o que seguramente demonstra que neste polímero encontramos unidades de arabinose 2-O ou 3-O substituídas (dados de metilação), o que tornaria estas unidades resistentes, sendo porém removidos de uma unidade por degradação de Smith (aqueles que são terminais), já que o hidrolisado mostra praticamente um polímero de galactose, representando o polissacarídeo II. Também podemos observar que o pico em δ 64.3 é bastante pronunciado quando comparado ao do polissacarídeo residual I, mostrando desta forma que o C-5 destas unidades foram liberados após o processo de Smith e que provavelmente estas arabinoses são agora terminais não redutoras. Pensamos que mais uma degradação de Smith, faria com que todas as unidades de Araf fossem oxidadas. Neste polissacarídeo II, analisando unidades de galactopirranose, observamos que os mesmos sinais obtidos na degradação anterior estão presentes (δ 105.2, 104.8 e 104.6, o que indica que estas unidades são resistentes à oxidação pelo periodato, comprovando-se esta resistência pelo sinal em δ 83.0 característico da ligação (1 $\rightarrow$ 3). Analisando a região de C-6, observa-se que o sinal de δ 62.8 e o de 62.4 permanecem bem

resolvidos indicando C-6 livre nas unidades de galactopirranose, como anteriormente. Porém, como podemos observar na Figura XVI (p. 101) de ^{13}C -n.m.r. DEPT do polissacarídeo residual II, proveniente da segunda degradação de Smith, tanto o pico em δ 62.8 como aquele em δ 71,0 (90) ainda encontram-se presentes, evidenciando claramente a presença de ligações (1 $\rightarrow$ 6) neste polissacarídeo II.

A Figura XVII (102), mostra os espectros de ^{13}C -n.m.r. dos polissacarídeos original I e II juntos, para que sejam melhor comparados.

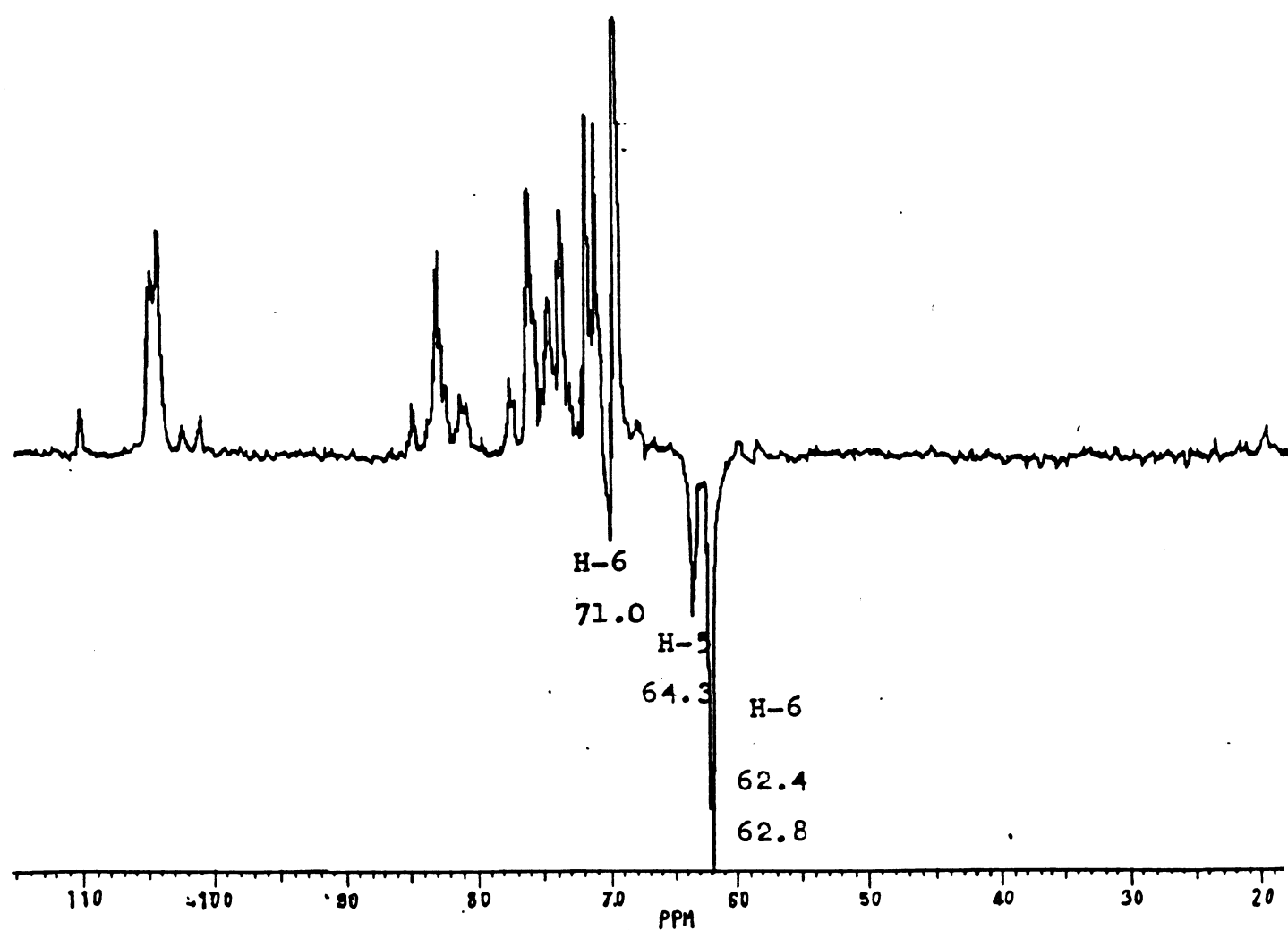


FIGURA XVI ESPECTRO DE ^{13}C -N.M.R. DEPT DO POLISSACARÍDEO II, OBTIDO APÓS DUAS DEGRADAÇÕES DE SMITH DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL DE Anadenanthera colubrina. O SOLVENTE UTILIZADO FOI O D_2O , A 50°C . OS VALORES NUMÉRICOS SÃO BASEADOS NO SINAL DO TMS ($\delta=0$).

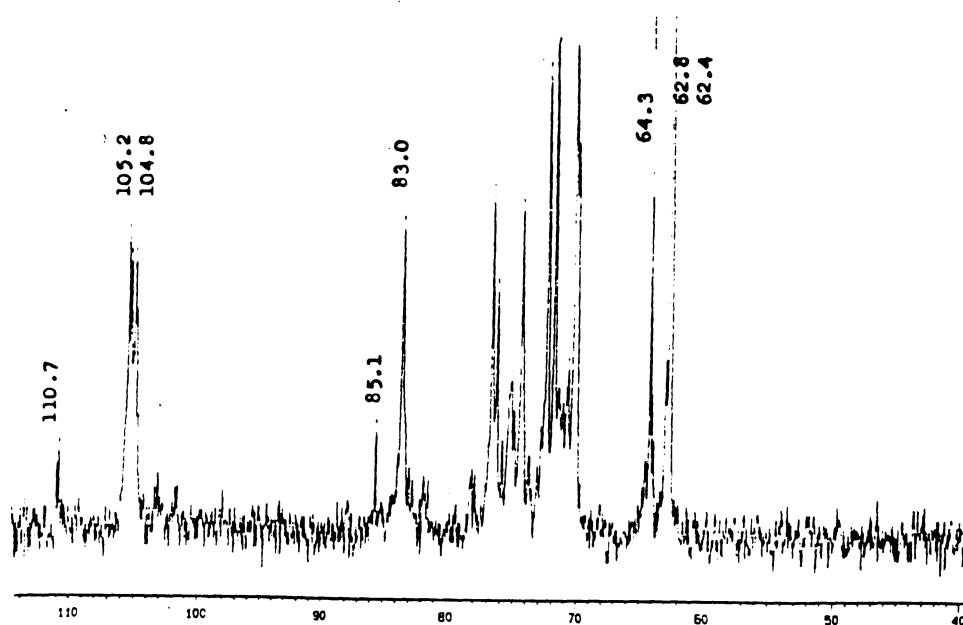
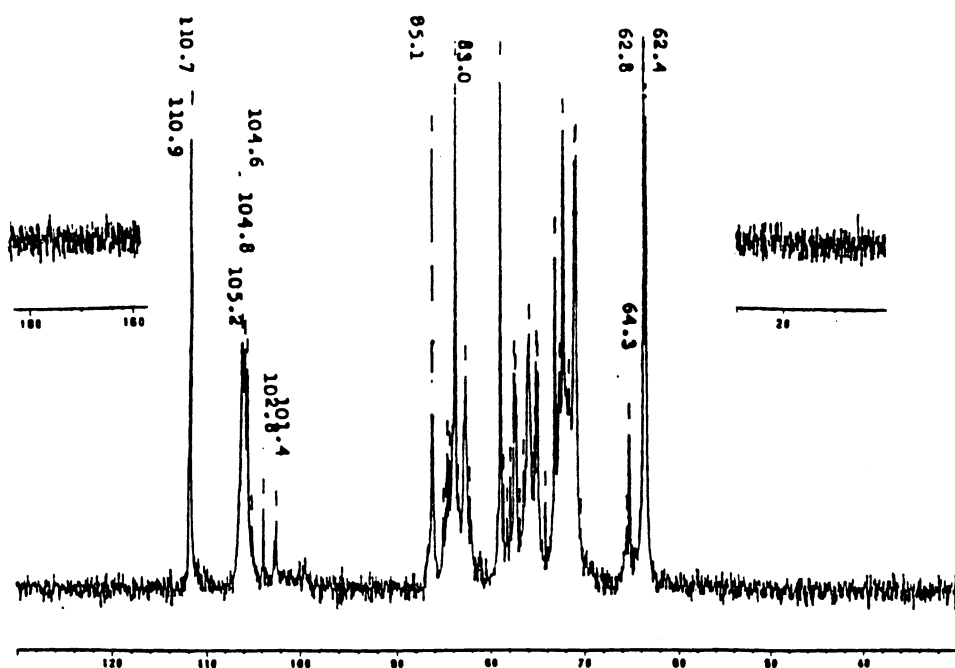
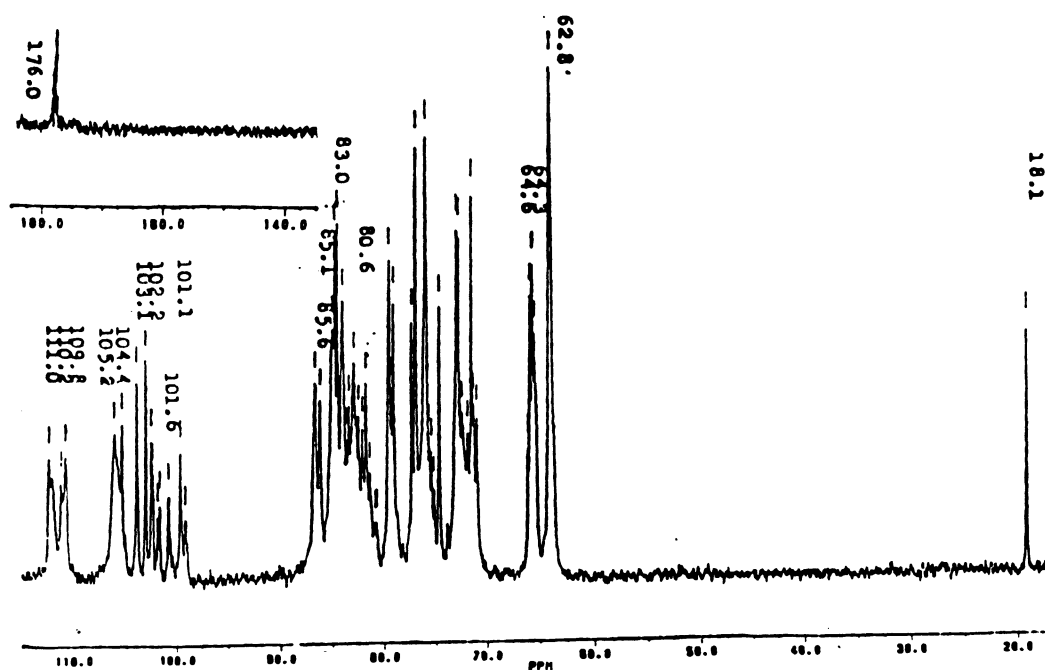


FIGURA XVII
ESPECTROS DE ^{13}C -N.M.R.
DOS POLISSACARÍDEOS
ORIGINAL, I E II.

DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

A aplicação dos polissacarídeos de Angico, numa coluna de Sepharose CL-4B (49), seguida da eluição com solução de NaCl 1M (16, 98) veio mostrar que os diversos tratamentos que sofreu o polissacarídeo original - sejam as duas degradações sequenciadas de Smith, sejam as hidrólises ácidas parciais, fizeram com que o peso molecular deste polissacarídeo diminuísse (Figura XVIII, p.104), um dado que concorda com os fornecidos pelos espectros de n.m.r das respectivas amostras, onde se pode perceber a simplificação da molécula original, após cada passo.

Assim sendo, o polissacarídeo original que tem um peso molecular aproximado de 1×10^6 , segundo a coluna descrita, origina após a primeira degradação de Smith o polissacarídeo I, o qual apresentou um K_{av} , cujo valor plotado num gráfico de dextranas padrões, indica um peso molecular provável de 600.000. O polissacarídeo II, conforme se esperava, apresentou um K_{av} maior, que corresponde a um peso molecular aproximado de 140.000.

Com os polímeros A e B, resultantes da hidrólise ácida parcial de uma e duas horas respectivamente, a queda aparenta ser acentuada, logo na primeira hora, com possíveis pesos moleculares de 390.000, caindo para 190.000 na segunda hora.

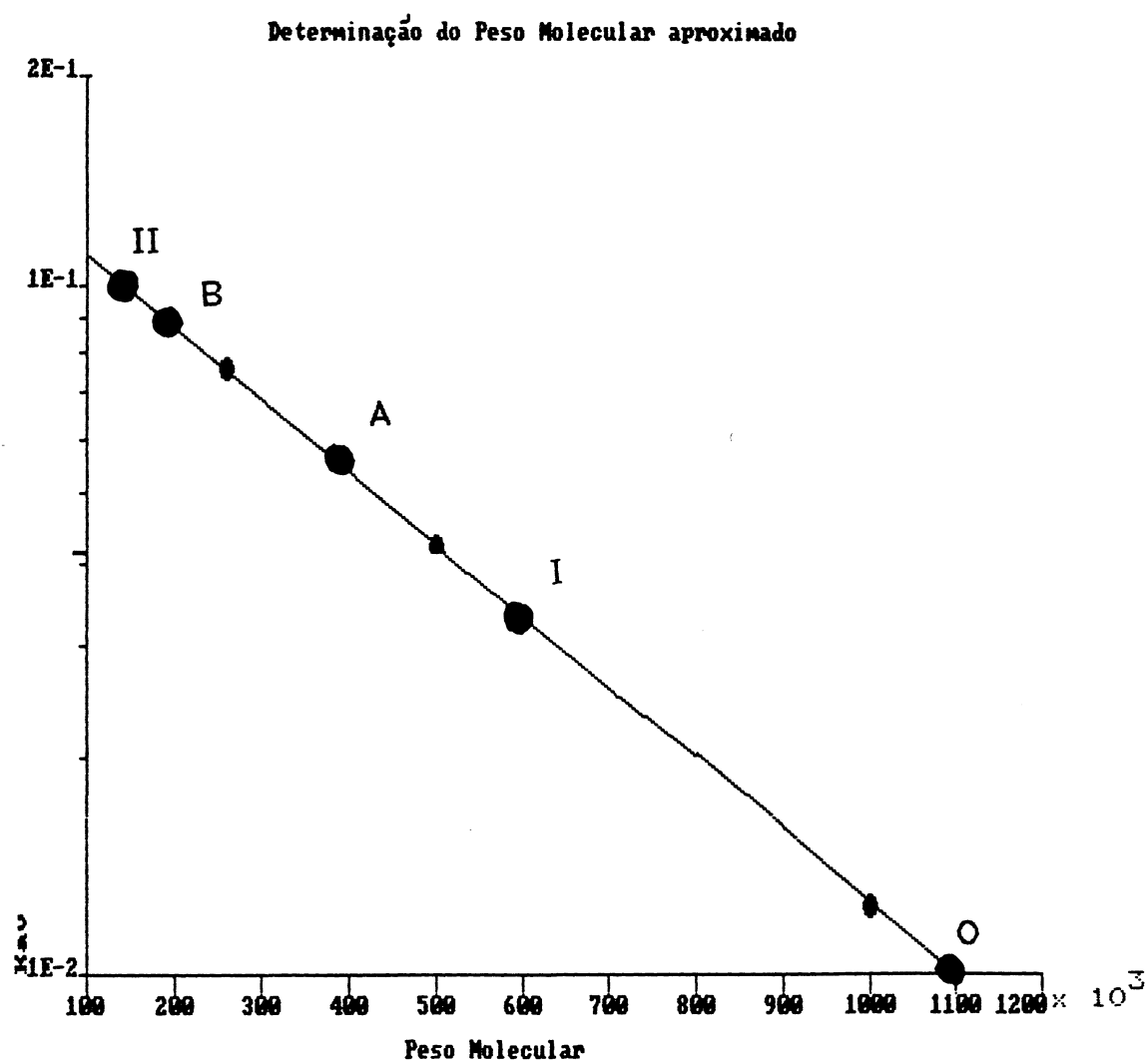


FIGURA XVIII DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR APROXIMADO DOS POLISSACARÍDEOS ORIGINAL, A, B, I E II, POR CÁLCULOS DO K'_{AV} , FEITOS A PARTIR DE UMA COLUNA DE SEPHAROSE CL-4B.

● - PADRÕES DE DEXTRANA

● - POLISSACARÍDEOS

Estas informações vêm apenas confirmar que a molécula original é susceptível à oxidação pelo periodato e que também apresenta externamente cadeias de unidades de arabinofuranoses, ligadas umas às outras por ligações glicosídicas lábeis à hidrólise ácida parcial.

Comparando-se o peso molecular do polissacarídeo II (proveniente da segunda degradação de Smith) com aquele do polissacarídeo B (proveniente da segunda hora de hidrólise parcial) percebe-se que são muito semelhantes (140.000 e 190.000 respectivamente), mas são polímeros diferentes, pois o polissacarídeo B apresenta 16% de ácido glucurônico, que não é encontrado no polissacarídeo II.

O perfil de eluição da coluna de Sepharose Cl-4B está mostrado nas Figuras XIX e XX (p. 106 e p.107). Os pesos moleculares aproximados e seus respectivos K_{av} s estão mostrados na Figura XVIII (104).

Todas as preparações (polissacarídeo original, I, II, A e B) mostraram-se monodispersos com relação ao peso molecular, como pode ser visto nas Figuras XIX e XX. Apesar de terem mostrado uma distribuição unimodal na determinação do peso molecular (51), não podemos afirmar que o polímero seja homogêneo (16, 21, 57, 58). Porém, como podemos observar pelo perfil de eluição, não houve fragmentação das estruturas por hidrólise ácida parcial, como já visto anteriormente nos espectros de ^{13}C -n.m.r. (ausência de grupos redutores), bem como pela análise do sobrenadante deste hidrolisado (Tabela II),

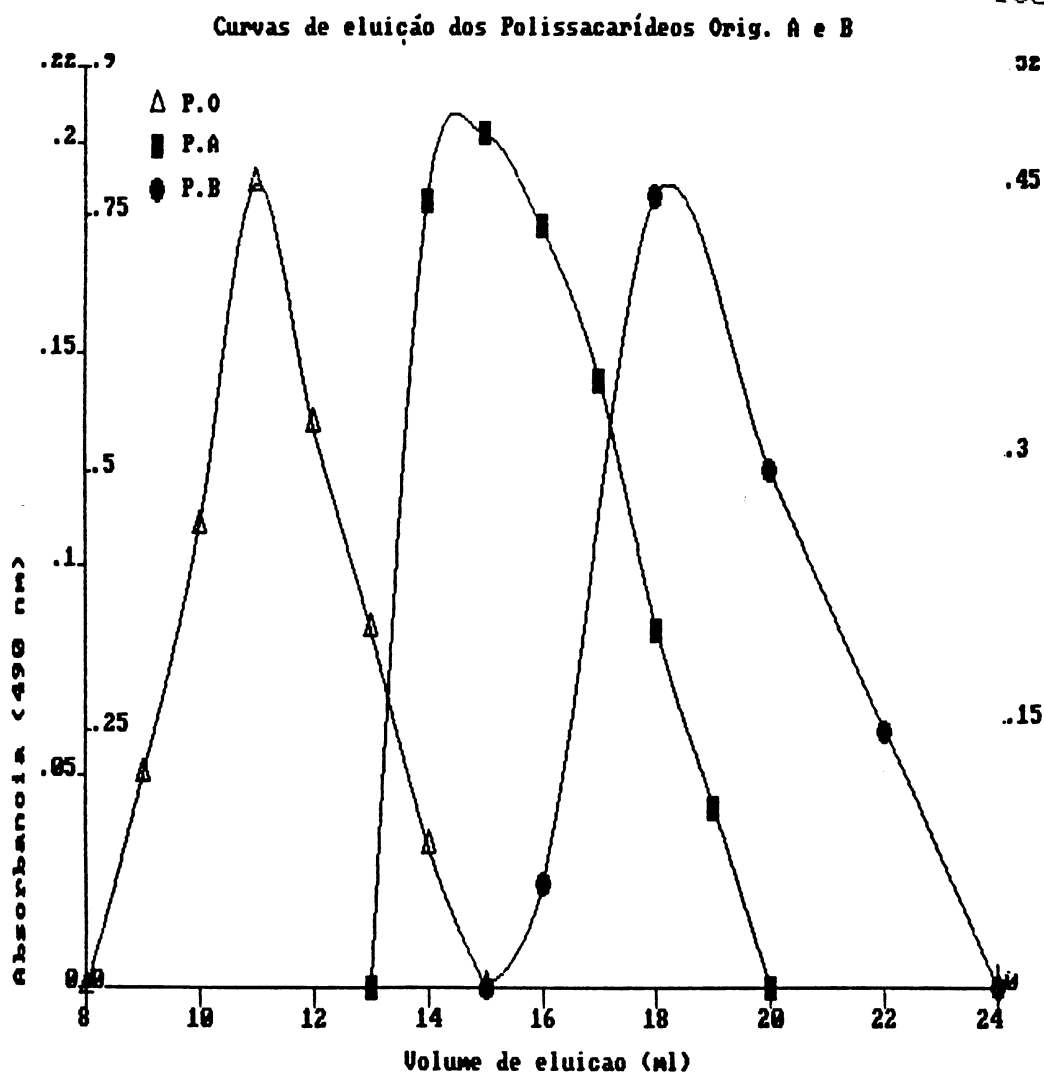


FIGURA XIX CURVAS DE ELUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ORIGINAL E DOS POLISSACARÍDEOS A E B (OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL POR 1 E 2 HORAS RESPECTIVAMENTE) EM COLUNA DE SEPHAROSE CL-4B.

P.O = polissacarídeo original

P.A = polissacarídeo A

P.B = polissacarídeo B

Volume morto (V_0) = 10 ml

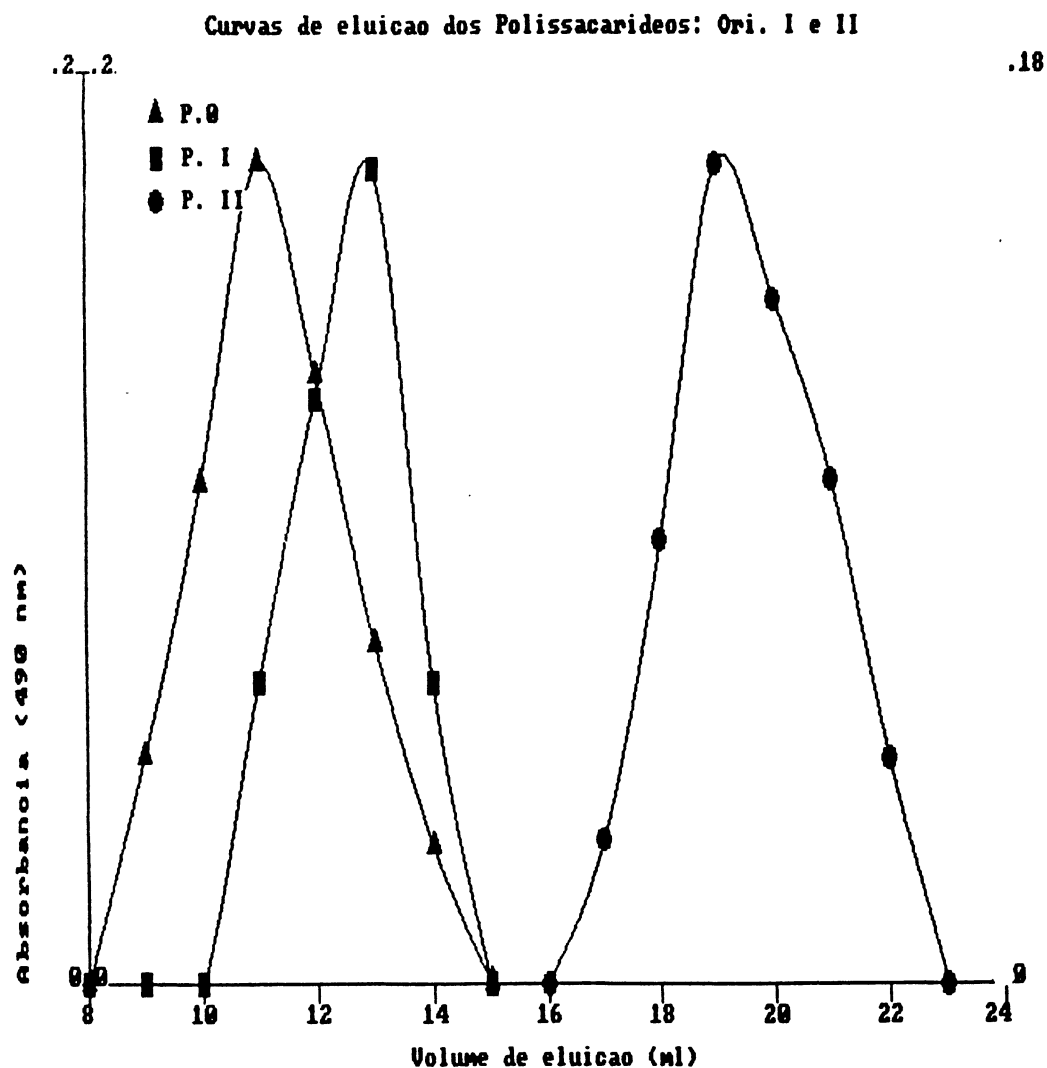


FIGURA X X CURVAS DE ELUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ORIGINAL E DOS POLISSACARÍDEOS I E II (OBTIDOS POR UMA E DUAS DEGRADAÇÕES DE SMITH DO POLISSACARÍDEO ORIGINAL RESPECTIVAMENTE) EM COLUNA DE SEPHAROSE CL-4B.

P.O = polissacarídeo original

P.I = polissacarídeo I

P.II = polissacarídeo II

Volume morto (V₀) = 10 ml

com a ausência de galactose (1% na 2^oh), quando executado este processo. O mesmo resultado pode ser deduzido dos experimentos com os polissacarídeos I e II, resultantes de uma e duas degradações do polissacarídeo original (Figura XX, p. 107) quando obtivemos na segunda degradação de Smith, praticamente uma galactana (com 7% de arabinose). Isto demonstra que o polissacarídeo de *A. colubrina* é uma molécula que apresenta difícil acesso a sua cadeia principal, já que também neste experimento de degradação de Smith, mostrou que não houve fragmentação do polissacarídeo.

CONCLUSÕES

1- O polissacarídeo do exsudato de *Anadenanthera colubrina* estudado por técnicas avançadas de espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., incluindo DEPT e INVERSA, bem como por espectroscopia de ^1H -n.m.r. mostrou-se constituído por :

1.1- Uma cadeia principal de β -galactopiranoses ligadas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 3), com a possibilidade de que possam também existir, ligações (1 $\rightarrow$ 6) neste núcleo.

1.2- Muitas unidades de α -arabinofuranose localizadas externamente e que funcionam como extremidades não redutoras. Ocorrem também unidades localizadas internamente e que funcionam como pontos de ramificação, ou como elo de ligação a outras unidades de arabinose, sendo então 2-O, 3-O e 5-O substituídas. Provavelmente existem também unidades de arabinose ligadas a unidades de galactoses da cadeia principal.

1.3- Unidades de α -ramnopiranoses que aparecem exclusivamente como extremidades não redutoras.

1.4- Unidades de ácido β -glucurônico que podem estar funcionando como extremidades não redutoras. Também podem ser 4-O substituídos (por α -arabinofuranose provavelmente).

2- Comparando-se com outros polissacarídeos de exsudatos estudados, observamos que o de *Anadenanthera colubrina* pertence

também ao grande grupo de arabinogalactanas do tipo II (de Stephen). Devido a seu alto peso molecular podemos dizer que assemelha-se às *Acacias* da série 4 de Benthham, porém os dados obtidos são insuficientes para este tipo de classificação.

3- Somente estudos posteriores, utilizando-se das mesmas técnicas utilizadas neste estudo, incluindo o estudo de oligossacarídeos produzidos por acetólise, hidrólises ácidas parciais e degradações de Smith, bem como uma terceira e talvez quarta degradação de Smith e ainda, metilações dos demais polissacarídeos, é que poderão elucidar mais claramente a estrutura deste complexo polissacarídeo.

4- Concluimos que este polissacarídeo, por ter aparentemente uma boa viscosidade e ser uma arabinogalactana, como a goma arábica, tem potencial para utilização na indústria. Porém, são necessários estudos das suas propriedades físico-químicas, para que isto possa ser confirmado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABDEL-AKHER, M ; HAMILTON, J.K.. The reduction of sugars with sodium borohydride. J. Am. Chem. Soc., Easton, v. 73, p. 4691-4692, 1951.
- 2 ADAMS, G.A.; BISHOP, C.T. Constitution of two aldobiouronic acids from wheat bran hemicelulose. J. Am. Chem. Soc., Easton, v. 78, p. 2842-2844, 1956.
- 3 ADINOLFI, M.; CORSARO, M.M.; MANGONI, L.; PARRILLI, M.. Studies of an acidic polysaccharide from *Encephalartos friderici guiliei*. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 222, p. 215-221, 1991.
- 4 ANDERSON, D.M.W.; BELL, P.C.. Partial structure of four *Acacia* gum exudates of the series Phyllodineae. Phytochemistry, Oxford, v. 15, p. 301-303, 1976.
- 5 ———. Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*. Anal. Chem. Acta., Amsterdam, v. 79, p. 185-187, 1975.
- 6 ANDERSON, D.M.W.; BELL, P.; MILLAR, J.R.. Composition of gum exudate from *Anacardium occidentale*. Phytochemistry, Oxford, v. 13, p. 2189-2193, 1974.

- 7 ANDERSON, D.M.W.; BELL, P.C.; MacNAB, C.G.A. An analytical study of some *Acacia* gum exudates of series *Botriocephalae*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 20, p. 269-274, 1971.
- 8 ANDERSON, D.M.W.; CREE, G.M. Studies on uronic acid. Part XXVII. The structure of the gum from *Acacia nubica* Benth. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 6, p. 385-403, 1968.
- 9 ANDERSON, D.M.W.; DEA, I.C.M.; HIRST, S.E. Studies on uronic acid materials. Part XXXII. Some structural aspects of the gum exudate from *Acacia seyal*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, V. 8, p. 460-476, 1978.
- 10 ANDERSON, D.M.W.; DEA, I.C.M.; SMITH, R.N. Studies on uronic acid materials. Part XXIX. Some structural aspects of *Acacia laeta* gum. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 7, p. 320-333, 1968.
- 11 ANDERSON, D.M.W.; DEA, I.C.M. Chemotaxonomic aspects of the chemistry of *Acacia* gum exudates. *Phytochemistry*, Oxford, v. 8, p. 167- 176, 1969.
- 12 ANDERSON, D.M.W.; DEA, I.C.M.. Studies on uronic acid materials. Part XXVIII. Some structural features of *Acacia drepanolobium* gum. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 109-120, 1968.
- 13 ANDERSON, D.M.W.; FARQUHAR, J.G.K.. The composition of eight exudates from the series *Gummiferae* and *Vulgares*. *Phytochemistry*, Oxford, V. 18, p. 609-610, 1979.

- 14 ANDERSON, D.M.W.; GILL, M.C.L.. The Composition of *Acacia* exudates from species of the subseries *Juliflorae*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 14, p. 739-741, 1975.
- 15 ANDERSON, D.M.W.; HIRST, S.E.; STODDART, J.F.. Studies on uronic acid materials. Part XXI. Some structural features of *Acacia arabica* gum. *J. Chem. Soc. (Lond)*, p. 1476, 1967.
- 16 ———. Studies on uronic acid materials. Part XV. The use of molecular sieve chromatography in studies on *Acacia senegal* gum (Gum Arabic). *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 2, p. 104-114, 1966.
- 17 ———. Studies on uronic acid materials. Part XVII. Some structural features of *Acacia senegal* gum (Gum Arabic). *J. Chem. Soc. (Lond) (C)*, p. 1959-1966, 1966.
- 18 ANDERSON, D.M.W.; MUNRO, A.C.. The structure of *Acacia campylacantha* gum. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 12, p. 9-22, 1970.
- 19 ANDERSON, D.M.W.; WEIPING, W.; LEWIS, G.P.. The composition and properties of eight gum exudates (Leguminosae) of American origin. *Biochem. Systemat. Ecol.*, Oxford, v. 18, n. 1, p. 39-42, 1990.
- 20 ASPINALL, G.O.. Isolation and Fractionation of Polysaccharides. In: *The Polysaccharides*. New York: Academic Press, 1982. v. 1, p. 19-26.

- 21 ———. Gums and Mucilages. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. New York, v. 24, p. 333-379, 1969.
- 22 ASPINALL, G.O.; BAILLIE, J.. Gum tragacanth. Part II. The arabinogalactan. J. Chem. Soc. (Lond), p. 1714-1721, 1963.
- 23 ASPINALL, G.O.; CARLYLE, J .J.; MacNAB, J.M.; RUDOWSKI, A.. *Anogeissus leiocarpum* gum. Part II. Fractionation of the gum and partial hydrolysis of *Leiocarpum* A. J. Chem. Soc. (Lond), (C), p. 840-845, 1969.
- 24 ASPINALL, G.O.; CARLYLE, J.J.; YOUNG, R.. *Acacia mearnsii* gum. Carbohydr. Res., Amsterdam, v.7, n.2, p. 109-120, 1968.
- 25 ASPINALL, G.O.; FAIRWEATHER, R.M.. *Araucaria bidwillii* gum. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 1, p. 83-92, 1965.
- 26 ASPINALL, G.O.; HIRST, E.L.; MATHESON, N.K.. Plant gums of the genus *Khaya*. The structure of *Khaya grandifoliola* gum. J. Chem. Soc. (Lond), p. 989-997, 1956.
- 27 ASPINALL, G.O.; KHONDO, L.; KINNEAR, J.A.. The hex-5-enoate degradation: cleavage of modified glycosiduronic acid linkages in methylated *Khaya ivorensis* gum. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 179, p. 211-221, 1988.

- 28 ASPINALL, G.O.; NASIR-UD-DIN.. Plant gums of the genus *Sterculia*. Part I. The main structural features of *Sterculia urens* gum. J. Chem. Soc. (lond), p. 2710 -2720, 1965.
- 29 ASPINALL, G.O.; JOHNSTON, M.J.; YONG, R.. Plant gums of the genus *Khaya*. Part III. The minor component of *Khaya senegalensis* gum. J. Chem. Soc. (Lond), p. 2701-2710, 1965
- 30 BEAUSQUENE, L.B.; PINKAS, M. TROTIN, F.. Gommès et mucilages uroniques. Revue. Ann. Pharmaceutiques Francaises. Paris, v. 40, n. 2, p. 179-190, 1982.
- 31 BERGER, J.R.; LESTER, D.. Water soluble polymers. In: DAVIDSON, R.L.; SITTIG, M.. Water soluble resins. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1962. p. 1-20.
- 32 BITTER, T.; MUIR, H.M.. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal.Biochem., New York, v. 4, p. 330-334, 1962.
- 33 BLAKE, J.D.; CLARK, M.L.. An arabinogalactan from sugar cane. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 115, p. 265-272, 1983
- 34 BOCK, K.; PEDERSEN, C.. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, New York, v.41, p.27-66, 1983.
- 35 BOKHARY, H.A.; HASSIB, A.M.; SULEIMAN, A.A.A.. Gamma irradiation effects on carbohydrate composition growth of microorganisms and ESR spectra of gum arabic (*Acacia senegal* L). J. Food. Protec., v. 46, n.7, p. 585-588,1983.

- 36 BOSE, S.; MOMOTA, B.. *Anacardium occidentale* gum: Part I-
Imunochemical and hydrolytic studies. Indian J. Biochem.,
Calcutta, v. 7, p. 68-72, 1970.
- 37 CARTIER, N.; CHAMBAT, G.; JOSELEAU, J.P.. An arabinogalactan
from the culture medium of *Rubus fruticosus* cell in
suspension. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 168, p.
275-283, 1987.
- 38 CHARLSON, A.J.; STEPHEN A.M.; RAVENSCROFT, N.. The
acetolysis of *Acacia salygna* (syn *Cianophylla*) gum
exudate. Can. j. Chem., Ottawa, v. 68, p. 1004-1005,
1990.
- 39 CHURMS S.C.; MERRIFIELD, E. H.; STEPHEN, A. M.. Structural
features of the gum exudates from some *Acacia* species of
the series Phyllodinae and Botryocephalae. Carbohydr.
Res., Amsterdam, v. 55, p. 3-10, 1977.
- 40 ———. A comparative examination of two polysaccharide
componente from the gum of *Acacia mabellae*. Carbohydr.
Res., Amsterdam, v. 63, p. 337-341, 1977.
- 41 CHURMS, S.C.; STEPHEN, A. M.. Mollecular struture of the
polysaccharide exudate from *Acacia bayleana* F. Muell.
Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 45, p. 291-298, 1975.
- 42 ———. Structural studies of an arabinogalactan protein
from the gum exudate of *Acacia robusta*. Carbohydr. Res.,
Amsterdam, v. 133, p. 105-123, 1984.

- 43 CORREIA, M.P.. Dicionário de plantas úteis do Brasil- e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1926. v. 1, p. 125-126.
- 44 DEFAYE, J.; WONG, E.. Structural studies of gum arabic, the exudate polysaccharide from *Acacia senegal*. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 150, p. 221-231, 1986.
- 45 DUBOIS, M.; GILLES, R.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F.. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., Washington, v. 28, n. 1, p. 350-356, 1956.
- 46 DYER, J.R.. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. Methods of Biochemical Analysis, New York, v. 3 p. 111-152, 1956.
- 47 FONTANA, J. D.; DUARTE, J. H.; IACOMIN, M.; GORIN, P.A.J.. Synthesis and chromatographic properties of isomeric O- β -D-galactopyranosyl-D-galactoses and of diastereoisomers of 3,4-O- and 4,6-O-(1-carboxyethylidene)-D-galactose. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 108, p. 221-228, 1982.
- 48 GAMMON, D.W.; STEPHEN, A.M.; CHURMS, S.C.. The glycoproteins of *Acacia erioloba* exudates. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 158, p. 157-171, 1986.
- 49 GEL FILTRATION - Theory and Practice. Bromma, Pharmacia LKB Biotechnology. p. 20-26.

- 50 GHOSAL, P.K.; THAKUR, S.. Structural studies of the acidic polysaccharide of *Spondias pinnata* gum exudate. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 98, p. 75-83, 1981.
- 51 GIBBONS, R.A.. Polydispersity. Nature, London, v.200, p. 665-666, 1963.
- 52 GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F.. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. Methods in Carbohydrate Chemistry, New York, v. 5, p. 361-369, 1965.
- 53 GOMES, V.M.V.. Bioquímica Clínica: Manual de práticas. Curitiba: UFPr, 1975. p. 148-149.
- 54 GORIN, P.A.J.. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. New York, v. 38, p. 13-104, 1981.
- 55 GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. Carbohydr. Res., v. 128, p. 119-132, 1984.
- 56 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, Ottawa, v. 53, p. 1212- 1224, 1975.

- 57 GREENWOOD, C.T.. The size and shape of some polysaccharide molecules. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. New York, v. 7, p. 289-332, 1952.
- 58 ———. ———. ———. New York, v. 11, p. 385-396, 1956.
- 59 HAWORTH, W.N.. A new method of preparing alkylated sugars. *J. Chem. Soc. (Lond)*, v. 107, p. 8-16, 1915.
- 60 HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F.. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York, v. 5, p. 357-361, 1965.
- 61 HEIDI, I.J.; GRAHAM, E.J.; RAVENSCROFT, N.; STEPHEN, A.M.. Structural aspects of 3-O- α -D-galactopyranosyl-L-arabinose and the corresponding substituted L-arabinitol. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 176, p. 300-305, 1988.
- 62 HERATH, H.M.T.; KUMAR, N.S.; WIMALASIRI, K.M.S.. Structural studies of an arabinoxylan isolated from *Litsea glutinosa* (Lauraceae). *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 198, p. 343-351, 1990.
- 63 HIRST, E.L.; PERLIN, A.S.. The gum of *Acacia pycnantha*: *J. Chem. Soc. (Lond)*, p. 2622-2627, 1954.
- 64 HOUGH, L.; JONES, J.K.N.. Chromatography. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, New York, v. 1, p. 21-31, 1962.

- 65 ———. ———. ———, New York, v. 1, p. 4-7, 1962.
- 66 ———. ———. ———, New York, v. 1, p. 7-8, 1962.
- 67 HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.H.. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J. Chem. Soc. (Lond), p. 1702-1706, 1950.
- 68 INOUE, S.. The determination of iduronic acid and glucuronic acid in heparins by a new technique. Re-evaluation of the variable hexuronic acid composition of mammalian heparins. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 329, p. 264-270, 1973.
- 69 JOLY, A.B.. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 10^aed. São Paulo: Editora Nacional, 1991. p. 352-372.
- 70 JONES, H.J.. Gas liquid chromatography of methylated sugars. Methods in Carbohydrate Chemistry, New York, v. 6, p. 25-41, 1972.
- 71 JONES, J. K. N.; SMITH, F.. Plant gums and mucilages. Advances in Carbohydrate Chemistry, New York, v. 4, p. 243-251, 1949.
- 72 JOSELEAU, J.P.; ULLMANN, G.. Biochemical evidence for the site of formation of Gum Arabic in *Acacia senegal*. Phytochemistry, Oxford, v. 29, p. 3401-3405, 1990.

- 73 KAPOOR, V.P.; FAROQI, M.T.H.; TARAVEL, F.R.; JOSELEAU, J.P..
Studies on *Acacia nilotica* gum exudates. Structural
variation due to different habitats. Carbohydr. Res.,
Amsterdam, v. 222, p. 289-293, 1991.
- 74 KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LOW, I.. Zur Permethylierung
von Zuckern und Glikosiden. Angew. Chem., v.67, n.1,
p. 32, 1955.
- 75 LEHNINGER, A.L.. Bioquímica. 2ªed.. São Paulo: Edgard
Blucher, 1976. p. 173.
- 76 LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FORR, A.L.. Protein
measurement with the phenol reagent. J. Biol. Chem.,
Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- 77 MANKARIOS, A.T.; JONES, C.F.G.; JARVIS, M.C.; TAERELFALL,
D.L.; FRIEND, J.. Hydrolysis of plant polysaccharides and
g.l.c. analysis of their constituent neutral sugars.
Phytochemistry, Oxford, v. 18, p. 419-422, 1979.
- 78 MARQUES, M.R.; XAVIER-FILHO, J.. Enzymatic and inhibitory
activities of cashew tree gum exudate. Phytochemistry,
Oxford, v. 30, n. 5, p. 1431-1433, 1991.
- 79 MARTINEZ, M.C.; PINTO, G.L.; RIVAS, C.. Composition of
Acacia macracantha gum exudates. Phytochemistry, Oxford
v. 31, p. 535-536, 1992.

- 80 PARIKH, V.M.; JONES, J.K.N.. Cholla gum- I- Structure of the degraded Cholla Gum. Can. J. Chem., Ottawa, v. 44, p. 327-333, 1966.
- 81 PAZUR, J.H.; MISKIEL, F.; WITHAM, T.F.; MARCHETTI, N.. Affinity chromatography of two sets of isomeric antibodies having specificity for different oligosaccharide units of gum arabic. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 214, p. 1-10, 1991.
- 82 PIGMAN, W.; HORTON, D.. The Carbohydrates- Chemistry and Biochemistry. 2.ed.. v. 2B. New York: Academic Press, 1970, p. 522-528.
- 83 PINTO, G.L.. Carbon-13 n.m.r. spectral study of *Acacia xanthophloea* gum and its degradation products. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 220, p. 229-241, 1991.
- 84 ROSENTHAL, R.T.F.. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Revista de Quimica Industrial, Rio de Janeiro, v. 24, n. 276, p. 17-19, 1955.
- 85 SANDFORD, P.A.; BAIRD, J.. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL, G.O.. The Polysaccharides. London: Academic Press, 1983. V. 2. p. 411-449.
- 86 SANDFORD, P.A.; CONRAD, H.E.. The structure of the *Aerobacter aerogenes* A 3 (SL) polysaccharide I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. Biochemistry., v. 5, n. 5, 1966.

- 87 SAULNIER, L.; BRILLOUET, J-M.; MOUTOUNET, M.; PENHOAT, C.H.; MICHON, V.. New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 224, p. 219-235, 1992.
- 88 SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A.. Quantitative determination of monosaccharides of their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Anal. Chem.*, Washington D.C., v. 37, p. 1602-1604, 1965.
- 89 SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G.. Determinaton of aldoses and uronic acid contents of vegetable fiber. *Anal. Biochem.*, New York, v. 96, p. 282-292, 1979.
- 90 SEN, A.K.; DAS, A.K.; BANERJI, N.; VIGNON, M.R.. Isolation and structure of a 4-O-methyl-glucurono-arabinogalactan from *Boswellia serrata*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 223, p. 321-327, 1992.
- 91 SLONEKER, J.H. Gas Liquid Chromatography of alditol acetates. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York, v. 4, p. 20-24, 1972.
- 92 SMITH, F.. The constitution of arabic acid. Part II. Degraded arabic acid. *J. Chem. Soc. (Lond) (C)*, p. 1724-1738, 1939.
- 93 SMITH, F.; MONTGOMERY, R.. *The Chemistry of Plant Gums and Mucilages*. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1959. p. 1-13.

- 94 SMITH, R.J.. Determination of moisture and ash. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, v. 4, p. 36-42, 1964.
- 95 STEPHEN, A.M.. Other Plant Polysaccharides. In: ASPINALL, G.O.. The Polysaccharides. London: Academic Press, 1983. v. 2, p. 97-180.
- 96 ———. *Virgilia oroboides* gum. Part VI. Further observations of acid hydrolysis. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 5, p. 335-336, 1967.
- 97 ———. The isolation of 5-O- α -L-arabopyranosyl-L-Arabinose from partly degraded gums of *Virgilia* species. J. Chem. Soc. (Lond), p. 1919-1921, 1957.
- 98 STODDART, J.F.; JONES, J.R.. Some structural features of *Citrus limonia*. Carbohydr. Res., Amsterdam, v.8, p.29-42, 1968.
- 99 TAYLOR, R.L; CONRAD, H.E.. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides, following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. Biochem., v.11, n.8, p. 1385-1388, 1972.
- 100 TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S.. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, London, v. 166, p. 444, 1950.

- 101 YOSHIDA, S.; KUSAKABE, I.; MATSUO, N. ONO, T.; SHIMIZU, K.; IASUI, T.; MURAKAMI, R.. Preparation of glucurono-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of corn hulls. Agric. Biol. Chem., Tokio, v. 54, n. 5, 1319-1321, 1990.
- 102 WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.. Industrial Gums-Polysaccharides and their derivatives. New York: Academic Press, 1959. p. 271-515.
- 103 WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A.. Acetylation. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, v. 2, p. 211-215, 1963.
- 104 ———. Reduction with sodium borohydride. Methods in Carbohydrate Chemistry. New Iork, v.2, p. 65-67, 1963.