

HELENA SIMÕES DUARTE

DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO DE ACETAL DE ÁCIDO PIRÚVICO
EM POLISSACARÍDEO DE MOLUSCO *Pomacea lineata* (SPIX, 1827)

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA
AO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA

CURITIBA, 1983

Orientada pelos professores

Dr. José Hazencleve Duarte e

Dr. Philip Albert James Gorin

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dr. José Hazencleve Duarte e Dr. Philip Albert James Corin pela orientação necessária à realização deste trabalho.

A Prof^a, Dr^a Déa Amaral pela análise da *D*-galactose através da galactose oxidase.

Ao Prof. Dr. Luiz A. Veiga pela dosagem da *L*-fucose através da *L*-fucose desidrogenase.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco através do PICD pela bolsa de estudo concedida para a realização do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e FINEP.

Aos colegas José Domingos Fontana, Marcello Iacomini e Gissélia Rabello Duarte pelas sugestões dadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, que, direta e indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Sr. Mytos K Mazurek do Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Canadá, pelos espectros de N.M.R.

Ao Prof. Marco Aurélio Lacombe Feijó pela colaboração na interpretação dos espectros de N.M.R.

SUMÁRIO

RESUMO	I
SUMMARY	IV
ABREVIATURAS	VII

INTRODUÇÃO

1. MATERIAL E MÉTODOS	32
Métodos Gerais	32
Preparação de β -D-glucose pentacetato	40
Preparação de xilitol pentacetato	41
Preparação de galactitol hexacetato	42
Preparação de 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol	42
Preparação do derivado 2,4-dinitrofenilidrazona do acetal de ácido pirúvico extraído dos polissacarídeos de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	43
Isolamento e purificação dos polissacarídeos isolados de glândulas de albúmem de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	44
Hidrólise ácida dos polímeros isolados de glândulas de albúmen de <i>P. lineata</i>	49
Hidrólise ácida dos polímeros isolados de glândulas de albúmen de <i>M. cornuarietis</i>	51
Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida dos polissacarídeos isolados de glândula de albúmen de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	52
Determinação enzimática da D-galactose nos produtos de hidrólise ácida dos polissacarídeos de glândulas de albúmen de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	54

Determinação enzimática da <i>L</i> -galactose e <i>L</i> -fucose nos produtos de hidrólise ácida dos polissacarídeos de glândulas de albúmen de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	55
Determinação da configuração anomérica das unidades dos polissacarídeos de glândula de albúmen de <i>P. lineata</i> pelo processo de oxidação com trixódio de cromo	56
Consumo do meta-periodato e ácido fórmico liberado dos polissacarídeos de glândula de albúmen de <i>P. lineata</i>	57
Consumo de meta-periodato e ácido fórmico liberado dos polímeros de <i>M. cornuarietis</i>	60
Análise tipo Smith dos grupos terminais dos polissacarídeos de <i>P. lineata</i>	60
Análise tipo Smith dos grupos terminais dos polissacarídeos de <i>M. cornuarietis</i>	62
Degradação seqüenciada tipo Smith dos polímeros de <i>P. lineata</i>	63
Investigação sobre a configuração acetálica do ácido pirúvico em polissacarídeo de <i>P. lineata</i> , e de acordo com o processo descrito por Sloneker e Orentas	67
Metilação dos polissacarídeos de <i>P. lineata</i>	68
Metilação dos polissacarídeos de <i>M. cornuarietis</i> ..	72
Metanólise dos polissacarídeos per- <i>O</i> -metilados de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	73
Obtenção de acetatos de alditóis parcialmente metilados de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	74
Determinação da configuração absoluta da galactose do polissacarídeo de <i>M. cornuarietis</i> , pelo processo de Leontein et al	74

Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono-13 e próton dos polissacarídeos	75
Preparação dos compostos químicos usados como referência na espectroscopia de ressonância nuclear magnética	76
Metil 3,4- <i>O</i> -[1-(hidroximetil)etilideno]- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo	76
Metil 3,4- <i>O</i> -[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo	77
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -furanosídeo: ácido livre <u>8</u> e sal de bário, o principal derivado do <i>O</i> -(1-hidroximetil)etilideno	78
Metil 6- <i>O</i> -benzil- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>2</u>	79
Metil 6- <i>O</i> -benzil-3,4- <i>O</i> -[1-(hidroximetil)etilideno]- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>3</u>	80
Metil 3,4- <i>O</i> -[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo	81
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>6</u> , ácido livre e o sal de bário derivados do maior isômero composto <u>3</u>	82
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>5</u> , ácido livre e sal de bário derivados do menor isômero composto <u>4</u>	83
Metil 6- <i>O</i> - β - <i>D</i> -galactopiranosil-3,4- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo	84
Metil 2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -galactopiranosil-3,4- <i>O</i> -[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo <u>11</u>	84
Metil 4,6- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo ..	86
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
Isolamento e purificação dos polissacarídeos de <i>P. lineata</i>	87

Composição química dos polissacarídeos de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	95
Análise de metilação dos polissacarídeos metilados de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	101
Oxidação com meta-periodato dos polissacarídeos de <i>P. lineata</i> e <i>M. cornuarietis</i>	116
Degradação seqüenciada tipo Smith dos polímeros de <i>P. lineata</i>	118
Determinação da configuração absoluta do acetal de ácido pirúvico no polissacarídeo de <i>P. lineata</i>	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

ESQUEMAS

Esquema I	88
Esquemas II - VII	115
Esquema VIII	130

FIGURAS

Figura 1	109
Figura 2	110
Figura 3	111
Figura 4	112
Figura 5	113
Figura 6	114
Figura 7	131

MODELOS

Modelos I e II	3
Modelo III	6

TABELAS

Tabela	I	90
Tabela	II	91
Tabela	III	92
Tabela	IV	99
Tabela	V	102
Tabela	VI	103
Tabela	VII	105
Tabela	VIII	108
Tabela	IX	117
Tabela	X	119
Tabela	XI	121
Tabela	XII	125
Tabela	XIII	126
Tabela	XIV	127
Tabela	XV	128

RESUMO

As galactanas ácidas isoladas de glândulas de albúmen de *Pomacea lineata* foram purificadas por precipitação fracionada, usando-se cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônia) em pH 7 e em pH 8,5, na presença de tampão borato. Ambos os polissacarídeos isolados (F.A e F.B, respectivamente), contêm unidades de β -D-galactopiranosose, grupo acetil e acetal de ácido pirúvico O-(1-carboxietilideno), numa relação molar de 23:5:1. A análise de metilação demonstrou que o grupo O-(1-carboxietilideno) foi ligado, numa proporção de 3% a O-3 e O-4 das unidades terminais não redutoras de F.A e F.B. Estes polímeros são altamente ramificados, tendo 38% de unidades terminais não redutoras de D-galactopiranosose, unidades 3,6-di-O-substituídas (41%) e de alguns segmentos lineares de unidades mono-substituídas em O-3 (11%) e em O-6 (6%). Estudos de degradação seqüenciada, tipo Smith, envolvendo três sucessivas etapas, demonstraram que os núcleos dos polissacarídeos são relativamente ricos em unidades 3-O-substituídas. As unidades resistentes à oxidação com periodato das frações desacetiladas de F.A e F.B, as quais contêm acetais, tanto podem ser cadeias laterais de unidades simples como partes de cadeias laterais mais longas, não suscetíveis à oxidação com periodato. No decorrer das sucessivas degradações, oxidação seletiva ocorre em cadeias laterais relativamente longas, cujos componentes terminais são 6-O-substituídas.

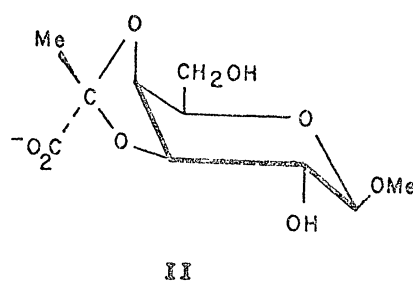
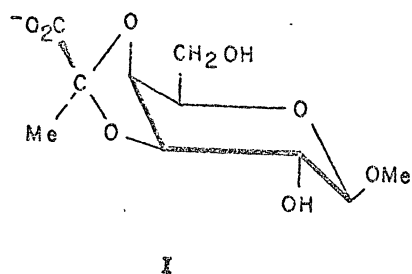
Os polímeros de *Marisa cornuarietis* diferem daqueles de *P. lineata*, por conterem, em adição à *D*-galactopiranose, unidades de *L*-fucopiranose nas unidades terminais não redutoras.

Com a finalidade de se determinar a configuração absoluta dos acetais de ácido pirúvico dos polissacarídeos de *P. lineata*, vários derivados de 3,4-*O*-(1-carboxietilideno) de metil β-*D*-galactopiranosídeos e de metil β-*D*-fucopiranosídeos foram preparados, cada um deles em ambas as formas configuracionais. Os espectros de ressonância nuclear magnética de C-13 e de próton destes derivados continham sinais configuracionalmente dependentes, e, deste modo, puderam ser comparados com os sinais equivalentes no espectro da galactana ácida. Com relação ao tamanho do anel do acetal, os desvios químicos do sinal, correspondendo aos carbonos acetálicos, não protonados, do polissacarídeo (δ 109,0) situam-se na região de anéis de 5 membros (δ 107-109,5) e não na de 6 membros (δ 100,5-102,4).

Os sinais de C-3 dos acetais de 3,4-(1-carboxietilideno) são típicos, sendo $\delta_C \sim 81$, tanto na forma de ácidos livres como na forma de sais de bário do derivado de metil β-*D*-galactopiranosídeo. No entanto, o valor exato, depende da configuração, sendo δ_C 81,1 no derivado I e de δ_C 80,4 no derivado II. Os sinais de CH₃ do acetal dos espectros de n.m.r. de próton são também bastantes úteis neste particular, apresentando valores de δ 1,97 e de δ 2,07 para I e II. (Os valores dos deslocamentos químicos, anteriormente citados,

são dependentes do pH). Com o auxílio dos sinais de n.m.r. da galactana, contendo acetal de ácido pirúvico, foi possível demonstrar a presença de algumas unidades com substituição acetálica e configuração semelhante às aquelas do isômero I.

O composto I (sal de bário) é de interesse em virtude de faltar no seu espectro de ^{13}C -n.m.r. as ressonâncias do carbono acetálico e carbonílico não protonado, quando obtido pelos processos usuais. Enquanto isto é devido, principalmente, aos altos valores de T_1 , os sinais do carbono acetálico não protonado, por sua vez, são comparativamente largos, por causa de leves mudanças configuracionais. No caso da ressonância do carbonil, a falta de sensibilidade é atribuída ao baixo valor de n.o.e. de 1,4 aproximadamente a metade do valor dos outros átomos de carbono da molécula.



SUMMARY

Acidic galactans isolated from the albumen glands of *Pomacea lineata* were purified by fractional precipitation using Cetavlon (cetyltrimethylammonium bromide) at pH 7 and at pH 8.5 in the presence of borate buffer. Both of the polysaccharides isolated (F.A and F.B, respectively) contained units of β -D-galactopyranose, acetyl groups, and pyruvic acid acetal [O-(carboxyethylidene)-substituent] in a molar ratio of 23:5:1. Methylation analyses showed that the O-(carboxyethylidene)-groups was linked, to the extent of 3%, to O-3 and O-4 of the nonreducing end-units of F.A and F.B. These polymers are highly branched, having 38% of nonreducing end-units of D-galactopyranose, 3,6-di-O-substituted (41%) and some linear segments of 3-O (11%) and 6-O-substituted (6%) β -D-galactopyranosyl units. Smith degradation studies involving 3 successive steps demonstrated that the nuclei of the polysaccharides are relatively rich in 3-O-substituted units. The periodate-resistant residues of deacetylated F.A and F.B, which contain acetals, are either principally single-unit side-chains or are part of longer side-chains not oxidized by periodate. In the course of the successive degradations, selective oxidation took place in relatively longer side-chains whose components were terminal and 6-O-substituted.

The polymers of *Marisa cornuarietis* differ from those of

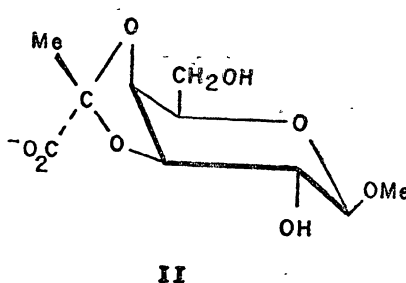
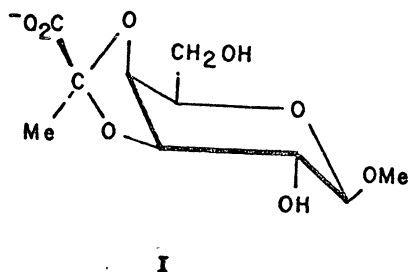
P. lineata, at least in that they have terminal units of *L*-fucopyranose.

In order to determine the absolute configuration of the pyruvic acid acetals of the *P. lineata* polysaccharide a number of 3,4-*O*-(1-carboxyethylidene)-derivatives of methyl β -*D*-galactopyranoside and methyl β -*D*-fucopyranoside were prepared, each of them in both configurational forms. Their carbon-13 and proton n.m.r. spectra contained

configurationally-dependent signals that were compared with equivalent signals in the spectra of the acidic galactan. In terms of the ring size of the acetal, the ^{13}C chemical shift of the signal corresponding to the non-protonated acetal carbons of the polysaccharide (δ_{C} 109.0) was in the region of 5-membered (δ_{C} 107-109.5) rather than 6-membered rings (δ_{C} 100.5-102.4).

The C-3 signals of 3,4-(1-carboxyethylidene) acetals are typical, being at $\delta_{\text{C}} \sim 81$ and in the case of the barium salt of the methyl β -*D*-galactopyranoside derivative. The exact value depends on the configuration, whether it is as in I (δ_{C} 81.1) or II (δ_{C} 80.4). The CH_3 signals of proton-n.m.r. spectra are also diagnostically useful, falling at δ 1.97 and 2.07 respectively. (The foregoing shift-values are pH-dependent). The pyruvic acid acetal-containing galactan from *P. lineata*, with the aid of its n.m.r. signals was shown to contain some residues that could be assigned a structure corresponding, in the positions of acetal substitution and acetal configuration, to structure of the compound I.

Compound (barium salt) is of interest as its ^{13}C -n.m.r. spectrum lacks non-protonated carbonyl and acetal carbon resonances, when obtained by the usual procedures. While this is principally because of long T_1 values, the non-protonated acetal carbon signals are comparatively broad, possibly through slow conformational interchange. In the case of the carbonyl resonance the lack of sensitivity is because of a low n.o.e. value of 1.4, approximately one half of other carbon atoms in the molecule.



ABREVIATURAS

V	- volts
mA	- miliampere
d.i	- diâmetro interno
g.l.c.	- cromatografia líquida e gasosa
TMS	- tetrametilsilano
p/p	- peso por peso
T	- tempo de retenção em g.l.c.
p.c.	- cromatografia em papel
t.l.c.	- cromatografia em camada delgada
F.A	- fração de galactana obtida em pH 7,0 do fracionamento com cetavlon do polissacárido de <i>P. lineata</i> .
F.B	- fração de galactana obtida em pH 8,5 do fracionamento com cetavlon do polissacárido de <i>P. lineata</i> .
F.AC	- fração de fucogalactana obtida em pH 7,0 do fracionamento com cetavlon do polissacárido de <i>M. cornuarietis</i> .
F.BC	- fração de fucogalactana obtida em pH 8,5 do fracionamento com cetavlon do polissacárido de <i>M. cornuarietis</i> .
F.AD-1	- fração de galactana pH 7,0 da primeira degradação tipo Smith.
F.AD-2	- fração de galactana pH 7,0 da segunda degradação tipo Smith.
F.AD-3	- fração de galactana pH 7,0 da terceira degradação tipo Smith.
F.BD-1	- fração de galactana pH 8,5 da primeira degradação tipo Smith.

F.BD-2	-	fração de galactana pH 8,5 da segunda de gradação tipo Smith.
F.BD-3	-	fração de galactana pH 8,5 da terceira de gradação tipo Smith.
nm	-	nanômetro
u.v.	-	ultravioleta
i.v.	-	infravermelho
g	-	grama
mg	-	miligrama
µg	-	micrograma
cm	-	centímetro
ml	-	mililitro
Eq	-	equivalente
vol	-	volume
sol	-	solução
v/v	-	volume a volume
sob.	-	sobrenadante
res.	-	resíduo
M	-	molar
N	-	normal
µl	-	microlitro
S	-	segundo
p.f.	-	ponto de fusão
Fig.	-	Figura
p.p.m.	-	partes por milhão
NAD ⁺ e NADH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo
h	-	hora, horas.
m/e	-	massa por carga de íon
n.O.e.	-	"nuclear Overhause enhancement" - efeito nuclear de Overhause
δ	-	deslocamento químico do sinal (p.p.m.) em ¹ H-n.m.r.
δ _c	-	deslocamento químico do sinal (p.p.m.) em ¹³ C-n.m.r.
T ₁	-	tempo de relaxamento longitudinal ("Spin lattice relaxation time").
T ₂	-	tempo de relaxamento transversal ("Spin-spin relaxation time").

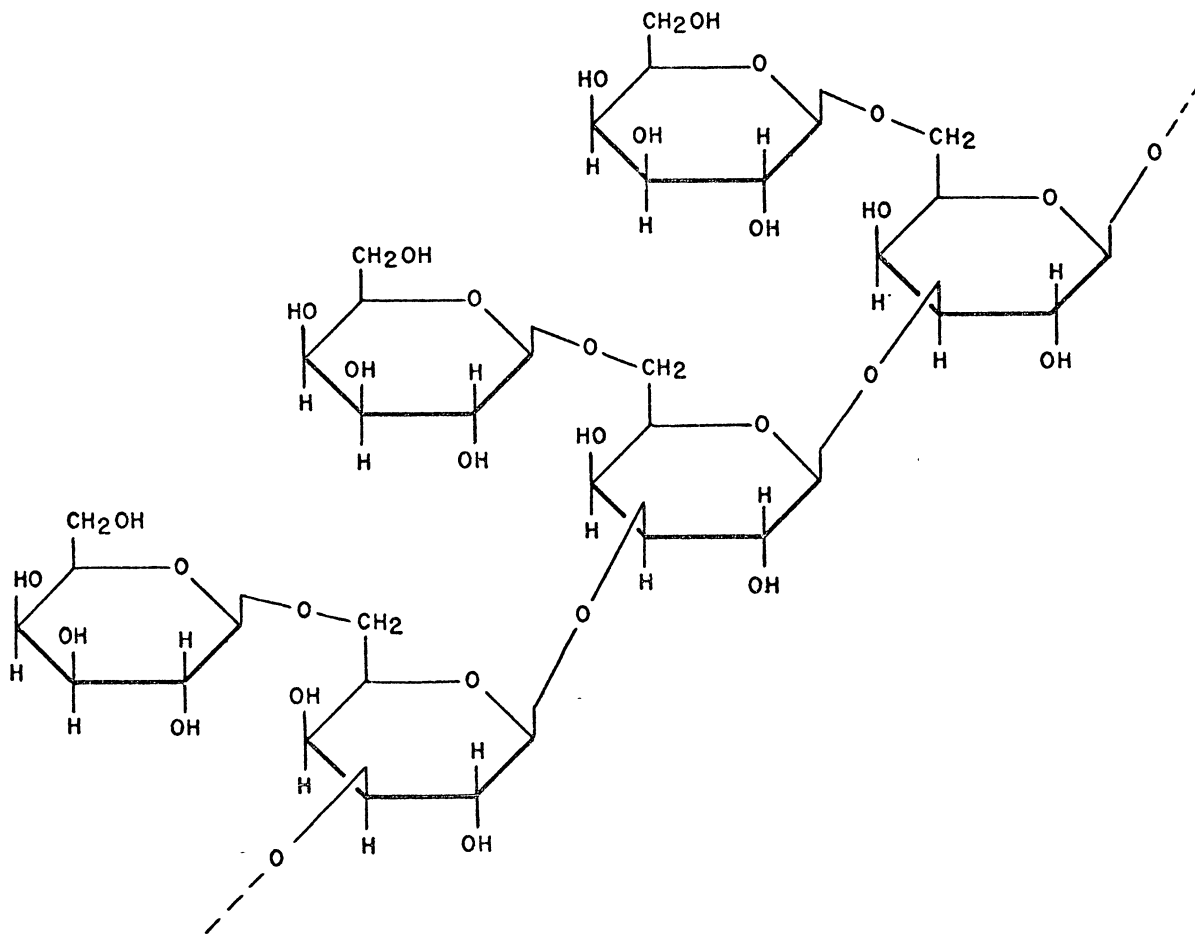
INTRODUÇÃO

O polissacarídeo de molusco foi estudado pela primeira vez por Hammarsten (52) quando, em 1885, extraiu um polissacarídeo de glândula de albúmen de *Helix pomatia*, o qual diferia do glicogênio, entre outras propriedades biológicas, por não ser digerido por amilase salivar.

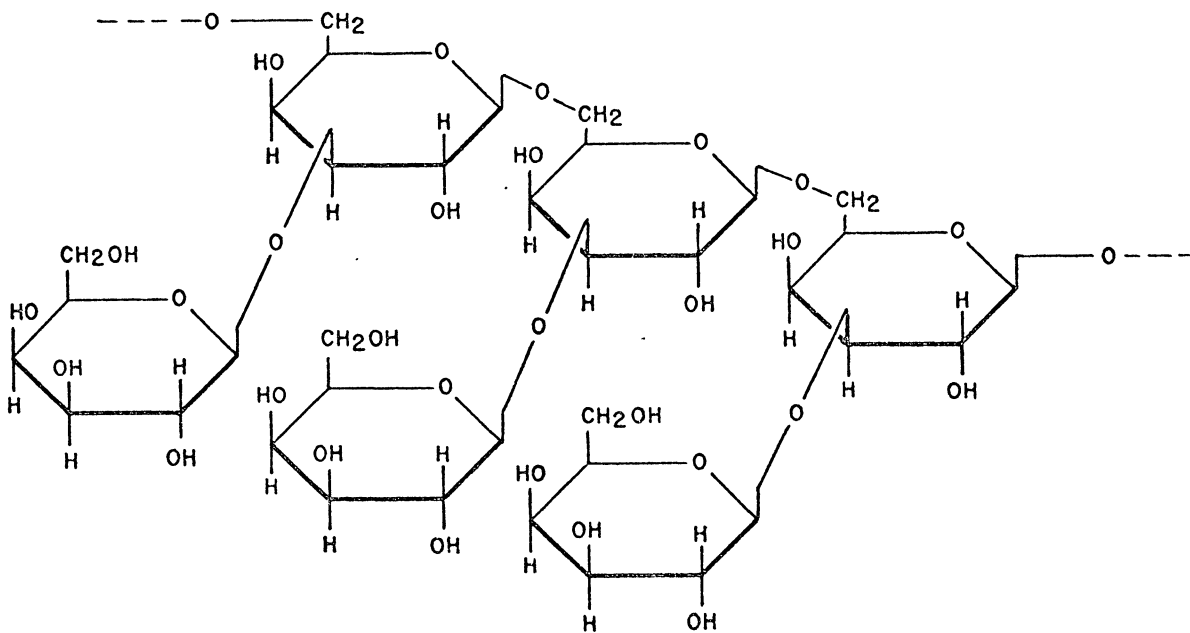
May, em 1832 (78), reinvestigando o polissacarídeo da glândula de albúmen de *H. pomatia*, verificou que, por hidrólise ácida, este polímero fornecia apenas galactose e por analogia com o glicogênio, denominou-o de galactogênio, o qual será referido no presente trabalho como galactana. Posteriormente, May (79) verificou que o polissacarídeo, isolado da massa de ovas de *H. pomatia*, era semelhante ao polímero isolado da sua glândula de albúmen. As investigações de May (78-80) sobre galactana de molusco, embora valiosas, não foram suficientes para esclarecer certos aspectos da estrutura fina desses polímeros.

Os estudos de metilação em galactana de molusco foram realizados, inicialmente, por Schlubach et al. (90) que demonstraram que a galactana isolada das partes moles totais de *H. pomatia*, quando metilada, era formada de quantidades equimoleculares de di- e tetra-*O*-metil-galactopiranoses. Tais compostos foram posteriormente identificados por Baldwin e Bell (10) como sendo 2,3,4,6-tetra-*O*- e 2,4-di-*O*-metil-galac-

topiranoses. Esses autores, baseados nesses dados, propuseram dois modelos alternativos para a estrutura da galactana de *H. pomatia*. Ambos os modelos apresentavam uma cadeia linear formada por unidades de galactopiranosose, substituídas em 0-3, e 0-6, com cadeias laterais simples em 0-6, no primeiro modelo (I) e em 0-3, no segundo (II). Bell e Baldwin (13), estudando mais detalhadamente o produto de hidrólise ácida da galactana de *H. pomatia*, na forma de derivado benziminazólico (2-DL-galactobenziminazol), verificaram que o polímero era formado de unidades de *D* e *L*-galactopiranoses, numa relação molar de 6:1. Numa tentativa de localizar as unidades de *L*-galactose no polímero, estes autores reinvestigaram o produto de hidrólise ácida da galactana metilada. Da fração de metil tetra-0-metil galactopiranosídeo, por um processo laborioso, envolvendo cristalização e redestilação a vácuo, obtiveram duas subfrações, sendo uma óticamente ativa (metil 2,3,4,6-tetra-0-metil- β -*D*-galactopiranosídeo), e outra, óticamente inativa. O componente desta última subfração, por tratamento apropriado, forneceu um derivado anilídeo, óticamente inativo, semelhante ao anilídeo obtido de uma amostra sintética de 2,3,4,6-tetra-0-metil-DL-galactopiranosose. Como não foi encontrada evidência de presença de *L*-galactose na fração de metil di-0-galactopiranosídeo, Bell e Baldwin (13) sugeriram que as unidades de *L*-galactose localizavam-se exclusivamente nas extremidades não redutoras do polímero, numa relação molar, deduzida a partir dos dados de rotação ótica, de 3:1 entre *D* e *L* galactose.



MODELO I



MODELO II

Bell e Baldwin (13), quando reinvestigaram os produtos de metanólise da galactana de *H. pomatia*, após metilação, concluíram que a relação, entre tetra-*O*- e di-*O*-metil-*D*-galactopiranosose, ao invés de 1:1, era de 4:3. A alteração desta relação, foi devido ao fato de a percentagem do derivado de tri-*O*-metil-*D*-galactopiranosose (considerado incompletamente metilado) ter sido acrescida à fração de tetra-*O*-metil-galactopiranosose. Baseados nestas novas evidências, sugeriram os autores outra possibilidade estrutural para o polímero de *H. pomatia*, a qual era representada por um agregado molecular composto de sete unidades de galactose. Tal agregado era formado de uma cadeia linear de três unidades de galactose com quatro cadeias laterais simples, uma das quais era constituída de *L*-galactose. Esta concepção estrutural coadunar-se-ia, apenas com um polímero de baixo peso molecular, segundo os próprios autores.

Recentemente, Bretting et al. (22) demonstraram que as galactanas de *Arianta arbustorum* e de *Cepea nemoralis* também apresentavam unidades de *D* e *L*-galactose em sua composição.

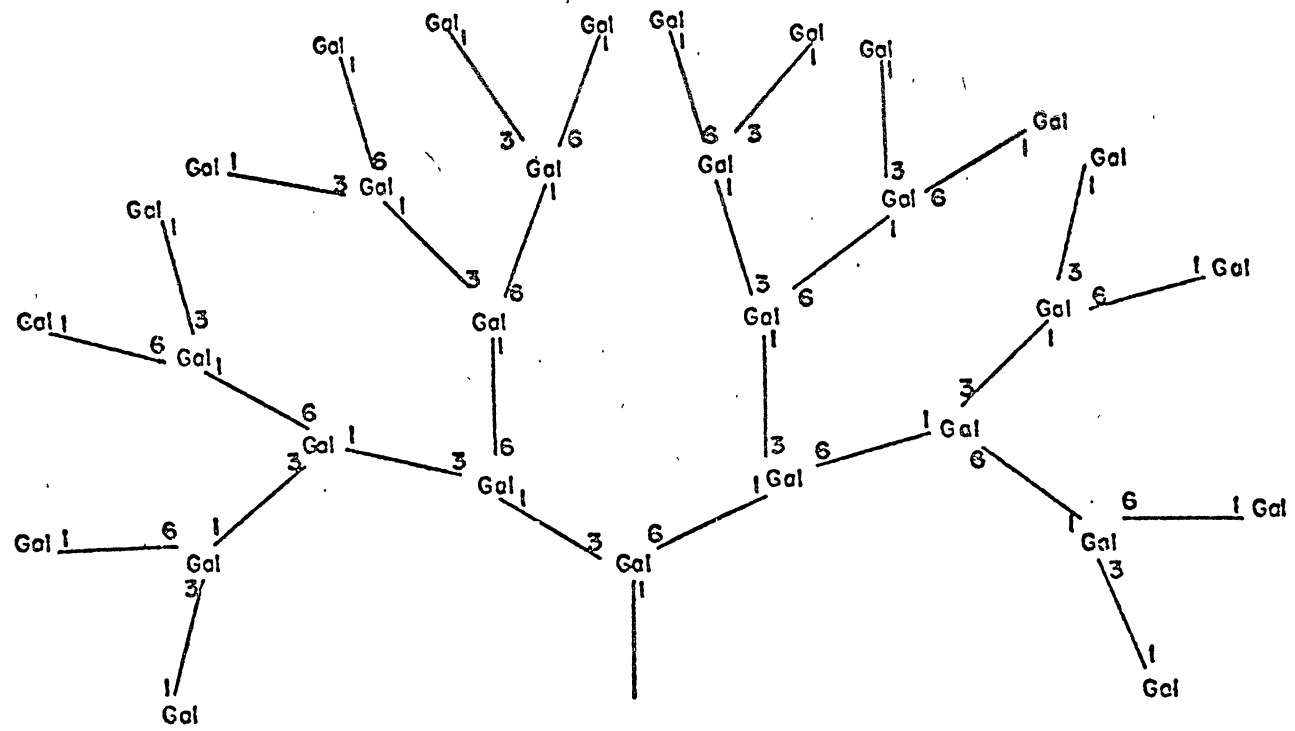
Aplicando a degradação seqüenciada tipo Barry (11) à galactana de *H. pomatia*, O'Colla (84) verificou que, após quatro degradações sucessivas, o polissacarídeo degradado correspondia apenas a 6% do polímero original. Foi verificado, ainda, que, a cada etapa oxidativa, 50% do polímero eram degradados. Estes dados estão em desacordo com a estrutura su

gerida por Baldwin e Bell (10, 13), pois o polímero, com estrutura I, seria suscetível, apenas, a uma etapa degradativa, enquanto o polímero, com a estrutura II, seria completamente degradado após duas sucessivas etapas degradativas. Assim sendo, O'Colla considerou improváveis tais modelos (I e II) e, com base nos resultados da degradação tipo Barry, propôs um novo modelo estrutural para a galactana de *H. pomatia*. Segundo este modelo, o polímero (III) era altamente ramificado, apresentando estrutura dicotômica, onde todas as unidades internas (galactopirranose) eram di-0- substituídas em C-3 e C-6, fornecendo uma relação equimolecular entre unidades terminais não redutoras e unidades dissubstituídas no polímero.

Correa *et al* (28), aplicando o processo degradativo, tipo Barry, à galactana isolada da glândula de albúmen de *Biomphalaria glabrata* e controlando o processo pelo peso seco do polímero recuperado após cada etapa degradativa, obtiveram resultados condizentes com o modelo proposto por O'Colla, para a galactana de *H. pomatia*.

A degradação de Barry forneceu informações valiosas sobre a estrutura das galactanas de moluscos (28, 84), mas muitos aspectos da estrutura fina deste polímero não foram esclarecidos em virtude de este processo degradativo não incluir a análise de metilação do polímero degradado.

Um estudo mais detalhado de metilação em galactana de molusco (*Strophocheilus oblongus*) foi realizado por



MODELO III

Duarte e Jones (32), através da análise por cromatografia líquida gasosa (g.l.c.) dos produtos de metanólise de polímero metilado (OMe 44,96%). Nestes estudos, obtiveram-se quantidades equimoleculares de 2,4-di-0- e 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactopiranosose (43 moles %) e ainda 2,4,6-tri-0- (11 moles %), 2,3,4-tri-0- (2,5 moles %) e vestígios (0,5 moles %) de 2,3,6-tri-0-metil-D-galactopiranosose. Este último derivado foi devido à metilação incompleta do polissacarídeo (8, 109). Estes resultados de metilação não se ajustavam a nenhum dos modelos estruturais, até então propostos, para galactana de molusco e, embora insuficientes para estabelecer um modelo estrutural, eram indicativos de uma molécula altamente ramificada e contendo segmentos lineares formados de unidades de D-galactopiranosose, substituídas nos oxigênios 0-3 ou 0-6.

Com a finalidade de se investigar a estrutura final de galactana de molusco, Diaz-Segura e Duarte (29) submetem a galactana de *S. oblongus* à degradação seqüenciada tipo Smith e, após três sucessivas etapas degradativas, recuperaram 6% do polímero. A análise de metilação do polissacarídeo, após cada etapa degradativa, mostrou um aumento na percentagem de 2,4,6-tri-0- e diminuição na percentagem 2,3,4,6-tetra-0- e 2,4-di-0-, além de grande oscilação na percentagem de 2,3,4-tri-0-metil-D-galactose. Estes dados, em conjunção com o isolamento de glicosídeos de baixo peso molecular nos produtos de hidrólise ácida, levaram os autores a postularem que a oxidação degradativa processa-se via grupos terminais não redutores e através de algumas unidades internas lo-

calizadas nas camadas mais periféricas do polímero. Deste modo, os grupos terminais não redutores que são formados e as novas unidades de *D*-galactopiranosose substituídas em 0-6 que são expostas, após uma etapa degradativa, são degradados durante a etapa subsequente do processo. Estes resultados indicam que a galactana de *S. oblongus* é altamente ramificada, apresentando, porém, estrutura distinta daquela proposta por O'Colla (84) e Corrêa (28) para galactanas de moluscos.

As galactanas de moluscos também foram investigadas por hidrólise ácida parcial, por vários autores (62, 106). Os oligossacarídeos obtidos de hidrólise ácida parcial da galactana de *Megalobulimus paranaguensis*, por Honda e Duarte (62), enquadram-se bem numa estrutura semelhante àquela proposta por Diaz-Segura e Duarte (29) para a galactana de *S. oblongus*. Os produtos de hidrólise foram separados por cromatografia em coluna e por cromatografia em papel e identificados por oxidação com meta-periodato, análise por metilação e rotação ótica. Assim foram caracterizados os derivados 3-0- β -*D*-galactopiranosil-*D*-galactose, 6-0- β -*D*-galactopiranosil-*D*-galactose, 0- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-0- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*D*-galactose, 0- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-0- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*D*-galactose, 0- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-0-[β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-*D*-galactose, 0- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-0- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-0- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*D*-galactose. Nesta investigação, também foram caracterizadas duas séries homólogas de oligossacarídeos, uma linear e outra ramificada. A série linear era for

mada de tri-, tetra-, penta- e hexassacarídeos, cujos oligosacarídeos eram constituídos de unidades de β -D-galactopiranose com substituição em 0-3, exceto a unidade terminal não reductora que apresentava ligação β -(1 \rightarrow 6). A série ramificada era composta de tetra-, penta-, hexa- e heptassacarídeos, os quais apresentavam uma cadeia principal formada de unidades de β -D-galactopiranose substituídas em 0-3, mas apresentando uma única cadeia lateral simples de β -D-galactopiranose em 0-6 (ponto de ramificação em 0-6). Estes dados adaptam-se a uma estrutura de galactana altamente ramificada, como sugerida por Diaz-Segura e Duarte (29). Weinland (106), anteriormente já havia, caracterizado vários oligossacarídeos, obtidos também da hidrólise ácida parcial da galactana de *H. pomatia*, os quais eram semelhantes àqueles isolados por Honda e Duarte (62) Weinland (106) também identificou entre os produtos de hidrólise ácida um dissacarídeo formado de unidades de D- e L-galactose, como sendo o 6-0- α -L-galactopiranosil-D-galactose. Corrêa et al. (28) identificaram dois oligossacarídeos nos produtos de hidrólise ácida parcial de galactana de *B. glabrata* como sendo 3-0- β -D-galactopiranosil-D-galactose e 6-0- β -D-galactopiranosil-D-galactose.

Moretto et al. (81), aplicando a degradação sequencial do tipo Smith à galactana de *M. paranaguensis* e analisando os polímeros degradados por processos de metilação, obtiveram resultados semelhantes aos obtidos por Diaz-Segura e Duarte (29) para a galactana do *S. oblongus*. Após três sucessivas degradações oxidativas, o polímero degradado (1% em relação

ao polímero original) apresentou 72 moles % de 2,4,6-tri-*O*-metil-*D*-galactose, 12 moles % de grupos terminais não redutores, além de 2,4-di-*O*- (12 moles %) e 2,3,4-tri-*O*-metil-*D*-galactose (4 moles %). Estes dados demonstram que o polímero degradado se torna mais linear e rico em unidades de β -*D*-galactopiranosose, dissubstituídas em *O*-3 e *O*-6. O mecanismo desta degradação oxidativa enquadra-se bem naquele já descrito por Diaz-Segura e Duarte (29).

Os fragmentos de baixo peso molecular obtidos da degradação seqüenciada do tipo Smith da galactana de *M. paraguensis* foram estudados, em detalhes, por Iacomini et al. (64), e os glicerol-glicosídeos (glicétil-glicosídeos) obtidos do processo degradativo (segunda degradação) adaptam-se bem à estrutura proposta por Diaz-Segura e Duarte (29) para a galactana de *S. oblongus*. Duas séries de glicosídeos de baixo peso molecular foram identificadas, sendo uma ramificada e outra, linear. A série linear era formada de *O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-glicerol, *O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-glicerol, *O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-glicerol, *O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-glicerol, *O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-glicerol ou *O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-glicerol. A série ramificada era composta de vários glicosil-gliceróis com

peso molecular médio de 1.067 e com um grau médio de polimerização de 7. A análise de metilação demonstrou que os oligossídeos desta fração eram ainda bastante ramificados, como testado pela percentagem de grupos terminais não redutores e de unidades dissubstituídas em 0-3 e 0-6 (23 moles %) e contendo em adição 2,4,6-tri-0- (39 moles %) e 2,3,4-tri-0-metil-D-galactose (6 moles %). Estes dados, aliados aos de oxidação com meta-periodato, sugerem que os oligossídeos desta fração apresentam uma cadeia principal formada de unidades de β -D-galactopiranosose substituída em 0-6, contendo algumas unidades substituídas em 0-3 por cadeias laterais de comprimento variável.

Recentemente, Iacomini et al. (65), estudando as galactanas de moluscos do gênero *Biomphalaria*, não observaram diferenças significativas entre os polímeros isolados, tanto da glândula de albúmen como da massa de ovas das três espêcies investigadas (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*). Os dados de metilação, análise tipo Smith dos grupos terminais, degradação seqüenciada tipo Smith (condição de hidrôlise suave) e oxidação com meta-periodato sugerem uma semelhança estrutural entre os polímeros vetores do *Schistosoma mansoní* e aqueles de glândula de albúmen do *S. oblongus* (29) e *M. paranaguensis* (81).

Um estudo comparativo, realizado entre as galactanas de massas de ovas de *B. glabrata*, recém-coletadas e coletadas cinco dias após a oviposição, demonstrou um decrêscimo

da percentagem dos grupos terminais não redutores de 43 para 34 moles %, paralelo às das unidades de β -D-galactopiranosose dissustituídas em 0-3 e 0-6. Também foi evidenciado um aumento das unidades de β -D-galactopiranosose substituídas em 0-3 e 0-6.

Estes resultados indicam que, durante o desenvolvimento embrionário, a galactana de massas de ovas de *B. glabrata* é degradada enzimaticamente a partir de suas unidades terminais não redutoras. Tal mecanismo envolveria a remoção de uma das unidades terminais de D-galactose, glicosilada em 0-3 ou 0-6 das unidades dissustituídas, localizadas nas camadas periféricas do polímero. Os autores (65), baseados nestes dados sugeriram que a galactana da massa de ovas funcionasse, portanto, como um polímero de reserva para o molusco, durante o desenvolvimento embrionário.

Diferenças estruturais têm sido observadas nas galactanas de vários moluscos. Embora tenha sido observada uma semelhança estrutural entre as galactanas isoladas de molusco de gênero *Biomphalaria* (65) e aquelas do gênero *Megalobulinus* (= *Strophocheilus*) (29, 81), o mesmo não ocorre com os moluscos do gênero (*Ampullarius*=*Pomacea*). Feijó e Duarte (39) isolaram um heteropolissacarídeo de massas de ovas de uma espécie de *Ampullarius* (Morretes, PR.), correspondendo a 6,4% do material original (peso seco) e era formado de unidade de D-galactopiranosose (98 moles %) e L-fucopiranosose (2 moles %). Análise tipo Smith dos grupos terminais demonstrou

uma predominância de glicerol (72 moles %) sobre *D*-galactopiranosose. A ausência de treitol excluiu a possibilidade de unidades de *D*-galactopiranosose com substituição em 0-4, neste polímero. A alta percentagem em glicerol indicava, entre outras, a presença de ligação (1+2)- β -*D*-galactopiranosose, a qual foi confirmada pela análise de metilação que apresentava 11 moles % de 3,4,6-tri-*O*-metil-*D*-galactopiranosose nos produtos de metanólises do polissacarídeo metilado. A análise de metilação também demonstrou que este polímero contém 29 moles % dos grupos terminais não redutores e que todas as unidades de *L*-fucopiranosose estavam localizadas nas extremidades não redutoras do polímero.

Duarte (30) isolou dois polissacarídeos ácidos de glândulas de albúmen de *Pomacea lineata*, (SPIX, 1827) (75) (anteriormente *Ampullarius* sp, Recife, PE), por precipitação fracionada, em presença de bases quaternárias (brometo de hexadeciltrimetilamônia, cetavlon) sendo uma em pH 7,0 e outra em pH 8,5 (em presença de tampão borato), respectivamente. Ambos os polímeros eram formados de unidades de *D*-galactopiranosose, acetal de ácido pirúvico e grupo acetil, numa relação molar de 17:1:4, respectivamente. Embora a posição e a configuração do acetal de ácido pirúvico não tenham sido completamente esclarecidos, a análise por infravermelho demonstrou absorção em 6,2 μ , (típica de íon carboxílico) e em 8,5 μ e 9,5 μ , sendo estas últimas absorções correlacionadas a uma estrutura cíclica, típica de um acetal. Foi demonstrada a ausência de 1,3-

0-(1-carboxietilideno)-treitol, nos produtos de hidrólise ácida suave (ácido sulfúrico, 0,5 M, à temperatura ambiente) e de treitol livre nos produtos de hidrólise total destes polímeros, quando submetidos previamente ao processo de oxidação com meta-periodato e redução com boridreto de sódio, como descrito por Sloneker e Orentas (94). Estes dados em conjunto indicavam que o ácido pirúvico não estava ligado aos oxigênios 0-4 e 0-6 das unidades de galactopiranosose terminais.

Em 1977, Petiz (87) realizou uma investigação na galactana de massa de ovos de *P. lineata* (Recife, PE). Submetendo este polissacarídeo à degradação seqüenciada tipo Smith (três degradações oxidativas) e analisando os polissacarídeos degradados por processo de metilação, observou um aumento da percentagem do derivado 2,6-di-0-metil-D-galactopiranosose nos produtos de metanólise de cada polímero metilado. A percentagem molar deste derivado nos produtos de metanólise dos polissacarídeos, correspondia aproximadamente à do acetal de ácido pirúvico, quantificada por processo enzimático em cada polímero degradado, não metilado. Durante o processo de metilação, o ácido pirúvico, em forma de acetal, resiste bem ao meio alcalino de reação, mas é liberado durante o processo de metanólise, gerando, deste modo, o derivado metil 2,6-di-0-metil-D-galactopiranosídeo. Não foi evidenciado se este grupo acetal se localizava nas extremidades não redutoras do polímero ou nas unidades internas do polímero.

Um polissacarídeo contendo acetal de ácido pirúvi

co também foi observado na glândula de albúmen de uma espécie de *Ampullarius* coletada em Santo Antonio da Platina, PR, por Borges (17), o qual se diferenciava dos polímeros isolados de outros moluscos do gênero *Ampullarius* (30, 39) por não conter *L*-fucose e grupo acetil. Neste polímero, a relação molar do *D*-galactopirranose e acetal de ácido pirúvico era de 20:1.

Em 1957, Hirase (57) isolou dos produtos de metanólise parcial do ágar um dissacarídeo contendo um acetal de ácido pirúvico por molécula. Este dissacarídeo, obtido como dimetil acetal e de fórmula $C_{12}H_{21}(OCH_3)_2COOH$, quando submetido a novo processo de metanólise originou o derivado 3,6-anidro-*L*-galactose dimetil acetal e um metil éster, metil glicosídeo. Este último derivado, por hidrólise ácida, deu origem à *D*-galactose e ácido pirúvico em quantidades equimoleculares. Estes dados já evidenciavam que o ácido pirúvico se ligava às unidades de *D*-galactose pelo seu grupo carboníla.

Posteriormente, Hirase (58), reestudando o derivado metil éster metil galactosídeo por técnica de metilação e submetendo o produto metilado à destilação à baixa pressão, obteve um composto que, por hidrólise ácida, liberava ácido pirúvico e o derivado 2,3-di-*O*-metil-*D*-galactose, o qual foi caracterizado na forma de anilídeo. Os resultados de metilação indicavam que o ácido pirúvico se ligava aos oxigênios *O*-4 e *O*-6 das unidades de *D*-galactose do composto investigado. Com base nos dados de metilação e nos valores de rota-

ção ótica, foi possível estabelecer a estrutura do composto de fórmula $C_{14}H_{21}(OCH_3)_2COOH$, isolado dos produtos de metanólise parcial do ágar, como sendo 4-0-[4',6'-0-(1-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosil]-3,6-anidro-L-galactose dimetil acetal.

Após as investigações pioneiras de Hirase (57, 58), polissacarídeos contendo acetal de ácido pirúvico foram isolados de vários microorganismos. Slonéker e Orentas (94), demonstraram que o polissacarídeo extracelular isolado de *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, continha, em adição ao ácido pirúvico (3-3,5%), D-glucose, D-manose, ácido glucurônico e grupo acetil, numa relação de 2,8:3,0:2,0:1,7. A ligação acetálica neste polímero foi estabelecida por uma série de reações envolvendo: oxidação com meta-periodato, redução com boridreto de sódio e hidrólise ácida suave (HCl por 24 horas e à temperatura ambiente). Após tratamento com hidróxido de bário, obteve-se o derivado de fórmula $(C_7H_{11}O_6)_2Ba$, o qual, por hidrólise ácida, forneceu ácido pirúvico e eritritol em quantidades equimoleculares. Estes dados indicam que o composto isolado do polissacarídeo B-1459 (na forma de sal de bário) é 1,3-0-(1-carboxietilideno)-eritritol e portanto, o ácido pirúvico no polímero B-1459 é ligado a certas unidades de D-glucose (terminais), constituindo o grupo 4,6-0-carboxietilideno.

Os espectros de infravermelho (absorção em $6,2\mu$ e $7,1\mu$, do íon carboxílico) e em $8,5\mu$ e $9,4\mu$, características

de estrutura cíclica contendo o grupo $-C-O-C-O-C$ e de espectroscopia de ressonância nuclear magnética de próton (1H -n.m.r.) (CH_3 em δ 1,4, $-CH-O$ e CH_2-O em 218 e 226 e $-OH$ em 332 c.p.s.) confirmam a ligação acetálica para o ácido pirúvico no polímero B-1459.

Gorin e Spencer (46) caracterizaram, por métodos químicos e por espectroscopia de ressonância nuclear magnética de próton (1H -n.m.r.), três compostos ácidos entre os produtos de hidrólise ácida parcial do polissacarídeo de *Corynebacterium insidiosum*, os quais apresentavam acetal de ácido pirúvico. O primeiro composto foi identificado como sendo 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-galactose com sinal de δ 1,65 em espectroscopia de 1H -n.m.r., correspondendo aos prótons desacoplados de grupo metil do acetal. Este composto foi convertido no derivado 4,6-*O*-(1-carboximetiletilideno)-*D*-galactitol por tratamento com boridreto de sódio e diazometano. O éster ($C_{10}H_{18}O_9$, p.f. de 104-105°), consumiu dois moles de periodato e liberou 1 mole de ácido fórmico. O espectro de ressonância dos dois acetais do ácido pirúvico, cujas estruturas foram identificadas como sendo 3-*O*-[4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- α -*D*-galactopiranosil]-*L*-fucose e *O*- β -*D*-glicopiranosil-(1+4)-[4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- α -*D*-galactopiranosil-(1+3)]-*L*-fucose, também apresentam sinais de δ 1,55 e 1,54, respectivamente, e típicos de prótons desacoplados do grupo metil do acetal.

As duas possibilidades configuracionais do anel

acetálico de 4,6-*O*-(1-carboxietilideno) α -*D*-galactose foram primeiramente estabelecidas por Gorin e Ishikawa (47) e baseadas principalmente na determinação da rotação molecular dos estereoisômeros de metil 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- α -*D*-galactosídeos e de metil 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- α -*D*-glucosídeos e secundariamente, nos valores das pontes de hidrogênios intramoleculares dos estereoisômeros de metil 4,6-*O*-(1-hidroxiisopropilideno)-2,3-di-*O*-metil- α -*D*-glucopiranosídeos. Estes autores admitiram que os acetais 4,6-*O*-substituídos estivessem com os anéis piranosídicos (anéis de seis membros) numa conformação 4C_1 (C_1 de Reeves) e que os anéis 1,3-dioxana estivessem numa conformação de cadeira. Inicialmente, o 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-galactose, obtido do bacto-ágar, foi convertido em um derivado de mais fácil obtenção por síntese, ou seja o metil 4,6-*O*-(hidroxiisopropilideno)- α -*D*-galactosídeo. Este composto e seu diastereoisômero também foram preparados, a partir do derivado metil 2,3-di-*O*-acetil-4,6-*O*-benzilideno- α -*D*-galactosídeo, com 1-acetoxi-2-propanona e na presença de ácido sulfúrico. Após tratamento apropriado, obteve-se um xarope contendo os dois estereoisômeros, sendo que um estereoisômero obtido por cristalização fracionada, apresentou sinal em espectroscopia de 1H -n.m.r. de δ 1,91 de C-CH₃. O isômero não cristalino foi transformado num derivado tribenzoato que era idêntico ao derivado tribenzoato do isômero obtido do bacto-ágar. Debenzoilação do composto sintético forneceu o derivado metil 4,6-*O*-(hidroxiisopropilideno)- α -*D*-galactosídeo com sinal em espectroscopia de 1H -n.m.r. de δ 1,83 de C-CH₃. Deste modo, obtiveram-se por

síntese dois diastereoisômeros, com um deles idêntico ao obtido do bacto-ágar.

Para comprovar as configurações acetálicas dos dois possíveis diastereoisômeros do metil 4,6-*O*-(hidroxiisopropilideno)- α -*D*-galactosídeos, aqueles autores oxidaram, com metaperiodato, entre outros compostos, 2,8-anidro-1-desoxi-*D*-glicero- β -*L*-gulo-octulopiranosose, seguindo de redução com bórido de sódio. Desta reação obteve-se o derivado 1,3-*O*-(hidroxiisopropilideno)-*L*-treitol o qual também é obtido do metil 4,6-*O*-(hidroxiisopropilideno)- β -*D*-galactosídeo e de seu correspondente diastereoisômero. Tratamento semelhante, realizado no composto 2,8-anidro-1-desoxi-*D*-glicero-*D*-gulo-octulopiranosose, originou o derivado 1,3-*O*-(hidroxiisopropilideno)-*L*-eritritol, o qual é também obtido dos dois possíveis diastereoisômeros do metil 4,6-*O*-(hidroxiisopropilideno)- β -*D*-glucopiranososes.

Para correlacionar a configuração dos acetais, pelo método de rotação molecular, aqueles autores preferiram investigar-los na forma de derivados de metil 4,6-*O*-(1-carbometoxietilideno)- β -*D*-hexapiranosídeos e consideraram que o sistema de anéis fundidos dos acetais de *D*-glucose e *D*-galactose apresentam anéis de 1,3-dioxana em duas formas alternativas de cadeira. Deste modo, a rotação do isômero com substituinte axial no acetal, menos a rotação de seu correspondente estereoisômero poderia dar valores iguais, mas de sinal oposto, nas séries de α -*D*-glucopiranosídeo e de α -*D*-galactopiranosídeo. Foi demonstrado que o diastereoisômero do metil 4,6-*O*-

(1-carbometoxietilideno)- α -D-glucopiranosídeo que contém um grupo axial é o que apresentou um valor de rotação positiva e menor (+81°) que seu correspondente estereoisômero (+103°). Assim, foi comprovado que o diastereoisômero do metil 4,6-O-(1-carbometoxietilideno)- α -D-galactopiranosídeo com um valor de rotação positiva e superior (+113°) ao do seu correspondente diastereoisômero (+107°) contivesse também um grupo metil axial no anel acetálico. Deste modo foi concluído que o derivado metil 4,6-O-(1-carbometoxietilideno)- α -D-galactopiranosídeo, obtido do bacto-ágar e do *C. insidiosum*, apresenta um grupo metil equatorial no anel acetálico, desde que este derivado comporta-se de modo semelhante ao estereoisômero (sintético) do metil 4,6-O-(1-carbometoxietilideno)- α -D-galactopiranosídeo, que por sua vez apresenta valor de rotação menor (+107°) do que seu correspondente estereoisômero (+133°).

A configuração do acetal de ácido pirúvico ligado ao 4,6-O das unidades terminais da D-glucose, no polissacarídeo de *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, foi estabelecida por Gorin et al. (48). O polímero, quando submetido à oxidação com o meta-periodato de sódio e redução com boridreto de sódio, liberou, por hidrólise ácida suave, o derivado 1,3-O-(1-carboxietilideno)-L-eritritol. Este composto foi esterificado com diazometano e o derivado 1,3-O-(1-carbometoxietilideno)-L-eritritol resultante, por redução com boridreto de sódio, deu origem a um derivado mais apropriado para estudos configuracionais, ou seja 1,3-O-(hidroxiisopropilideno)-L-eritritol. Os valores de rotação ótica e de espectroscopia de

$^1\text{H-n.m.r.}$ (sinal de C-CH_3 em δ 1,86) deste último derivado eram semelhantes ao do estereoisômero com C-CH_3 equatorial e distintos dos valores do estereoisômero com C-CH_3 axial (sinal de C-CH_3 em δ 1,95).

Após os estudos pioneiros sobre a configuração do acetal de ácido em polissacarídeo realizados por Gorin et al. (47, 48), foi constatada a presença de acetal de ácido pirúvico em vários polissacarídeos isolados de microorganismos. Desse modo, Björndal et al. (19) investigaram um polissacarídeo ácido extracelular produzido pelo *Rhizobium meliloti*, o qual era formado de unidades de *D*-glucose, *D*-galactose, acetal de ácido pirúvico e grupo acetil, numa relação molar de 7:1:1:1. Estudos de metilação demonstraram, entre outros derivados metilados, o 2,3-di-*O*-metil-*D*-glucose, o qual indica que o grupo acetal do ácido pirúvico se ligava a *O*-4 e *O*-6 das unidades de *D*-glucose. Não foi relatada a configuração do 4,6-*O*-(1-cáboxietilideno)-*D*-glucosil nestes polímeros.

Acetais de ácido pirúvico ligados a duas unidades distintas de um mesmo polissacarídeo demonstrou-se que ocorre com polissacarídeo ácido de *Rhizobium trifolii*, TA-1 por Chaudhari et al. (26). Nas investigações de metilação, neste polímero foi demonstrado que o derivado metilado 2,3-di-*O*-metil-*D*-galactose origina-se das unidades de 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-galactose que estão localizadas como unidades terminais não redutoras do polímero. Por outro lado, a presença de 2-*O*-metil-*D*-glucose, entre os produtos de hidrólise

ácida do polissacarídeo original e metilado, mas ausente nos produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado após remoção do ácido pirúvico, sugere que o derivado mono-*O*-metil representa a unidade de 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-glucopiranosose substituída em *O*-3. Estas sugestões são consubstanciadas pelo aparecimento dos derivados 2,4,6-tri-*O*-metil-*D*-glucose e 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-galactose entre os produtos de hidrólise ácida do polímero metilado, após remoção do grupo acetal. O polissacarídeo extracelular da *Xanthomonas campestris* foi reinvestigado por Jansson et al. (66). Os dados de metilação do polímero demonstraram que a soma dos derivados metilados 2,3-di-*O*-metil-*D*-manose e 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-manose apresentava um valor correspondente ao do derivado 2,6-di-*O*-metil-*D*-glucose. Estes éteres metílicos de *D*-manose derivam, portanto, das unidades terminais do polímero, em parte substituídas com acetal de ácido pirúvico. Deste modo, o derivado 1,3-*O*-(1-carboxietilideno)-eritritol, observado por Siddiqui (93) na degradação de Smith deste polímero, não poderia derivar da unidade 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-glucose terminal, a qual originaria, por metilação, o derivado 2,3-di-*O*-metil-*D*-glucose. Os resultados, portanto, indicam que, no polissacarídeo extracelular de *X. campestris*, o acetal de ácido pirúvico se liga ao *O*-4 e *O*-6 das unidades terminais de *D*-manose e não às unidades de *D*-glucose. A determinação da configuração absoluta do átomo de carbono acetálico realizada previamente por Gorin et al. (48) não é invalidada por esta revisão.

Ao contrário dos polissacarídeos ácidos já investigados, o polissacarídeo capsular de *Pneumococcus* tipo IV apresenta uma alta percentagem do grupo acetal, conforme demonstraram Lew e Heidelberger, em 1976, (73). Os produtos de hidrólise ácida do polímero metilado apresentavam 79 moles % de 6-*O*-metil-*D*-galactose e 21 moles % de 2,3,6-tri-*O*-metil-*D*-galactose e traços de 4,6-di-*O*-metil-*D*-galactose. Sob as mesmas condições de hidrólise do polímero desacetilizado e metilado, as percentagens do derivado eram: 98 moles % de 2,3,6-tri-*O*-metil-*D*-galactose e 2 moles % de 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-galactose. Estes dados, portanto, indicam que este polissacarídeo é formado, em sua maior parte, por unidades de 2,3-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-galactose, com interligação glicosídica (1→4).

Acetal de ácido pirúvico também foi demonstrado em polissacarídeo, contendo 6-desoxi-hexose, por Bebault et al. (12) que investigaram um polissacarídeo de *Klebsiella* serotipo K 32 que continha acetal de ácido pirúvico ligado às posições *O*-3 e *O*-4 das unidades de *L*-ramnose, que glicosidava em *O*-2. Esta evidência foi obtida pela análise dos produtos de hidrólise ácida do polissacarídeo original e metilado, a qual demonstrou a presença de 2,3-di-*O*- e 2,4-di-*O*-metil-*L*-ramnose, 2,4,6-tri-*O*-metil-*D*-galactose e *L*-ramnose. Por outro lado, após remoção parcial do ácido pirúvico, análise dos produtos de hidrólise ácida do polissacarídeo apresentava uma diminuição acentuada da percentagem de *L*-ramnose e uma alta percentagem de 3,4-di-*O*-metil-*L*-ramnose. Estes dados

eram suficientes para comprovar o posicionamento do grupo acetal. As características principais deste polímero eram a presença de β -L-ramnose e a grande labilidade do grupo acetal a ácido. Aproximadamente 70% do grupo acetal foi removido por tratamento do polissacarídeo com resina trocadora de íon [Amberlite IR-120 (forma H^+)] e à temperatura ambiente.

Esta suscetibilidade do grupo acetal de ácido pirúvico é explicada, em parte, pelo acetal se ligar aos grupos hidroxílicos vicinais, transdiequatoriais das unidades de L-ramnopiranosose, na conformação 1C_4 . Acetais de ácido pirúvico ligados às hidróxilas vicinais transdiequatoriais ocorrem também nos polissacarídeos capsulares de *Pneumococcus* tipo IV, (73) e de *Klebsiella* tipo 1, investigado por Erbing et al. (38). Em todos estes casos, o grupo acetal era facilmente removido por hidrólise ácida suave. Vale ainda ressaltar que, no polímero de *Klebsiella* tipo 1, a ligação acetálica se faz com as hidróxilas em C-2 e C-3 das unidades do ácido D-glucurônico, cujo posicionamento foi estabelecido por um processo de metilação do polímero reduzido. Para este fim, o polímero foi inicialmente tratado com 1-cicloexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida e $NaBD_4$ afim de reduzir as hidróxilas das unidades do ácido urônico. O derivado 6-O-metil-D-glucose, obtido na análise de metilação do polissacarídeo reduzido, foi deuterado em C-6 e isto é uma indicação de que este composto deriva das unidades de ácido D-glucopiranosilurônico. Por outro lado, o polissacarídeo carboxil reduzido, do qual o ácido

pirúvico foi removido por hidrólise ácida suave, deu, entre outros derivados metilados, o 2,3,6-tri-*O*-metil-*D*-glucose. Isto indica que ácido urônico é glicosilado em *O*-4 e acetalizado em *O*-2 e *O*-3.

Recentemente, Garegg et al. (43) reestudaram a configuração acetálica de ácido pirúvico, por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. em modelos preparados como descritos previamente por Gorin e Ishikawa (47). A diferença observada nos deslocamentos químicos dos carbonos dos CH_3 acetálicos, em pares estereoquímicos de 4,6-acetais examinados, é ampla e suficiente para determinar a estereoquímica de carbonos 4,6-acetálicos nas correspondentes unidades de monossacarídeos em polissacarídeos. Assim, os valores médios observados para os carbonos de CH_3 equatoriais eram de δ_{C} 24,4-26,1, e para aqueles de carbonos CH_3 axiais eram de δ_{C} 15,0-18,3. Os correspondentes deslocamentos químicos para os grupos CH_3 dos 3,4-acetais, em espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., embora pequeno, eram ainda de significância. Em adição, os deslocamentos dos sinais de prótons de CH_3 em espectroscopia de ^1H -n.m.r. eram suficientes para identificar o arranjo estérico do carbono acetálico do ácido pirúvico ligado a *O*-3 e *O*-4 das unidades de galactopiranosil em polissacarídeo; principalmente após redução aos correspondentes derivados hidroxiisopropilidênicos. Nesta investigação, a configuração do carbono acetálico foi expressa pelo sistema S-R. Posteriormente, Garegg et al. (44), estabeleceram a configuração do carbono acetálico em vários polissacarídeos de bactérias por comparar os sinais por espectroscopia

de ^{13}C - e ^1H -n.m.r. destes polissacarídeos com aqueles das substâncias modelos. A configuração S foi demonstrada em oito polissacarídeos, nos quais o ácido pirúvico é ligado a O-4 e O-6 de unidades de *D*-glucopirranose ou *D*-manopirranose, enquanto a configuração R foi demonstrado em quatro polissacarídeos nos quais o ácido pirúvico é ligado a O-4 e O-6 de unidades de *D*-galactose. Em todos estes acetais, que formam anéis 1,3-dioxana, o grupo metil é equatorial e o grupo carboxílico é axial. A forma S foi observada em quatro polissacarídeos nos quais o ácido pirúvico é ligado a O-3 e O-4 das unidades de *D*-galactopirranose.

Recentemente, Gorin et al. (49), reestudaram a configuração acetálica de ácido pirúvico no polissacarídeo de *C. insidiosum* por espectroscopia de ^1H - e ^{13}C -n.m.r. No espectro de ^1H -n.m.r., os polissacarídeos têm sinais de δ 1,24 (6H) e δ 1,41 (3H) e foram atribuídos aos prótons dos grupos metil das unidades de *L*-fucopirranose e acetal de ácido pirúvico. Já no espectro de ^{13}C -n.m.r. do polissacarídeo, os sinais, em δ_c 27,1, foram atribuídos ao carbono do grupo metil do acetal de ácido pirúvico, em configuração R. Neste mesmo espectro, o sinal em δ 17,3 foi atribuído ao carbono do grupo metil da unidade de *L*-fucopirranose e não a um acetal com configuração S cujo sinal aparece em δ_c 17.

A função dos acetais de ácido pirúvico ligados a polissacarídeos tem sido investigada por vários autores. Hirase, (58), em 1957, sugeriu que o grupo carboxílico do ácido

pirúvico pudesse estar relacionado com o comportamento gelificante do ágar. Os resultados das investigações de Duckworth e Yaphe (34) mostraram que o conceito de o ágar ser constituído de dois polissacarídeos, um neutro, agarose e outro, ácido, agarpectina é uma simplificação. Segundo estes autores o ágar é uma mistura complexa de vários polissacarídeos, contendo todos a mesma estrutura básica, com graus variáveis de substituintes ácidos. Pelo menos três frações distintas de polissacarídeos foram caracterizadas, sendo uma rica em sulfato, outra em ácido pirúvico e uma terceira, formada, principalmente, de unidades de 3,6-anidro-*L*-galactopiranosose.

Foi observada uma diminuição do poder gelificante nas frações com alta percentagem de unidades sulfatadas e com baixa percentagem de 3,6-anidro-*L*-galactose e que as frações ricas em ácido pirúvico apresentavam baixo poder gelificante. Estas observações estão de acordo com o conceito de Rees (88), de que a capacidade de formar gel do ágar é devido aos três átomos de hidrogênio equatoriais das unidades de 3,6-anidro-*L*-galactose que compelem o polissacarídeo a assumir a conformação helicoidal e as interações das hélices são as responsáveis pela formação do gel.

As investigações de Dudman e Heidelberger (36) e de Heidelberger et al. (56) indicam que o acetal de ácido pirúvico do polissacarídeo seja um determinante imunológico. O anti-soro de polissacarídeo de *Pneumococcus* tipo 27 dava reação cruzada com polissacarídeo de *R. meliloti* e *R. trifolii*.

O ácido pirúvico presente em todos estes polímeros explicaria a reatividade destas cruzadas reações.

A remoção do ácido pirúvico de um polissacarídeo de uma espécie de *Rhizobium* tornava-o inativo para seu anti-soro homólogo e para o anti-soro de *Pneumococcus* tipo 27, mas era ativo para anti-soros de outros tipos de *Pneumococcus*, para os quais o polímero original não apresentava nenhuma reatividade. O acetal de ácido pirúvico foi também considerado ser determinante imunológico em polissacarídeos de *Klebsiella* K 32, *Pneumococcus* tipo IV e de várias cepas de *Rhizobia*.

Segundo Garegg et al. (43) o acetal de ácido pirúvico de polissacarídeos bacterianos, faz parte do determinante imunológico, e é muito provável que a configuração absoluta destes acetais esteja correlacionada com a atividade imunológica de tais polímeros. Portanto, a determinação de configuração absoluta do acetal de ácido pirúvico em polissacarídeos é de grande relevância.

Um estudo comparativo entre polissacarídeos extracelulares elaborados por *Rhizobium meliloti* U 27, *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 e *Agrobacterium radiobacter*, IFO 1266S foi realizado por Harada et al. (53). Os espectros de ^1H -n.m.r. destes polissacarídeos demonstraram a presença de acetal de ácido pirúvico (sinal de δ 1,48) éster de ácido succínico ("multiplet" em δ 2,59) e grupo acetil (δ 2,15). Pela primeira vez, foi comprovada a presença de ácido pirúvico em

polissacarídeo de *R. meliloti*, o qual contém, em adição, grupo acetil.

Estes polímeros quando tratados com uma enzima extracelular, a succinoglicana despolimerase de uma espécie de *Flavobacterium*, liberaram unidades de octassacarídeos as quais por sua vez são hidrolizados em duas unidades de tetrasacarídeos por uma enzima intracelular, a β -D-glicanase, também isolada da mesma *Flavobacterium*. Os dados da metilação e de espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., demonstram que esses polímeros apresentam a mesma estrutura básica, ou seja são formados de unidades repetidoras de octassacarídeos contendo 4,6-acetal de ácido pirúvico ligado apenas na extremidade não redutoras do polímero.

Hisamatsu et al. (59) obtiveram uma mutante (mutante 22) por tratamento, do *Alcaligenes faecalis* ou *myxogenes* 10C3, com *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrossoguanidina. Esta mutante acumulava, no meio sintético de cultura, não só succinoglicana, como também um oligossacarídeo, (octassacarídeo livre) principalmente, quando ao meio de cultura era acrescentada penicilina ou bacitracina. O octassacarídeo livre apresenta uma estrutura semelhante ao octassacarídeo derivado da succinoglicana, por hidrólise, com o succinoglicana despolimerase. Os autores sugerem que os oligossacarídeos que acumulam nos meios, de cultura, não derivam da hidrólise enzimática da succinoglicana, mas são devidos a mudanças no sistema de biossíntese da succinoglicana. Foi comprovada, por análise de metilação, a presença de 4-6-acetal do ácido pirúvico,

ligada às unidades terminais (*D*-glucose) de todos os octassacarídeos livres, do meio de cultura. Os octassacarídeos livres, além de acetal de ácido pirúvico, continham ésteres do ácido succínico, cuja localização é ainda incerta. Isto diferencia os octassacarídeos livres daqueles obtidos da succinoglicana por hidrólise enzimática específica. A análise do produto de hidrólise ácida dos octassacarídeos (livres) metilados, demonstrou entre os derivados metilados, 2,3-di-*O*-metil-*D*-glucose que é originado das unidades de 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-glucopiranosose, localizadas nas extremidades não redutoras do oligossacarídeos. Análise semelhante, nestes oligossacarídeos, dos quais o ácido pirúvico foi previamente removido, suas unidades terminais não redutoras originam por metilação, os derivados 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-glucose. A função de ácido pirúvico e do ácido succínico, nestes octassacarídeos livres, não foi discutida.

Posteriormente Hisamatsu et al. (60) demonstraram que esta unidade repetidora de octassacarídeo, era comum não só às succinoglicanas de *A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3 e de *R. meliloti* como também aos polímeros de *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes* e *Agrobacterium tumefaciens*.

Os polissacarídeos contendo acetal de ácido pirúvico, até então investigados, foram isolados de microorganismos. Pela primeira vez, foi comprovada por Duarte (30) a presença de polissacarídeo contendo acetal de ácido pirúvico no polissacarídeo de molusco, *Pomacea lineata*.

A finalidade da presente investigação é, portanto, esclarecer certos aspectos estruturais dos polissacarídeos isolados de glândulas do albúmen de *Pomacea lineata* (Recife, PE), bem como estabelecer a configuração do acetal de ácido pirúvico nos polímeros de *P. lineata*.

MATERIAL E MÉTODOS

MÉTODOS GERAIS

As rotações óticas foram obtidas com polarímetro Perkin-Elmer, modelo 141, à temperatura de 25°. A eletroforese em fitas de papel acetilado (14 x 25, cm) (cellogel) das amostras de polissacarídeos foi realizada, corando-se previamente os polissacarídeos com azul de "Procion", segundo o método descrito por Dudman e Bishop (37), utilizando-se câmara de imersão da Chametron, fonte estabilizadora da Fanen Ltda., a 250 mA, e 7V e tampão borato 0,025 M, pH 9,3. As soluções contendo os polissacarídeos foram liofilizadas em aparelhos Virtis, modelo 10-145 MR-Ba. As leituras espectrofotométricas foram feitas em espectrofotômetro Varian 635 D, a $30 \pm 0,1^\circ$ e Colleman Junior, modelo 6A. Os espectros de infravermelho dos polissacarídeos foram realizados em espectrofotômetro, modelo 735, da Perkin-Elmer.

A cromatografia em papel foi realizada com papel Whatman nº 1 ou 3MM pelo método descendente, com os seguintes sistemas de solventes: (v/v) (a) benzeno-*n*-butanol-piridina-água (1:5:3:3) fase superior; (b) *n*-butanol-piridina-água (4:3:4); (c) *n*-butanol-etanol-água (4:1:5); (d) butanona-água-amônia (200:17:1) fase superior; (e) *n*-butanol-etanol-água (5:1:4); (f) éter-ácido fórmico-água (5:2:1); (g) 1-butanol-etanol-água (40:11:19).

Os açúcares foram visualizados com nitrato de prata alcalino (101) ou com cloridrato de p-anisidina (açúcar reductor) (67) e a migração dos produtos de hidrólise ácida das galactanas foi relacionada à da *D*-galactose (R_{gal}), enquanto a migração dos produtos de hidrólise ácida dos polissacarídeos metilados foi relacionada ao 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-glucopirranose. A hidrazona do ácido pirúvico foi visualizada com ortofenilenodiamina 0,05% em ácido tricloroacético 20% (21) e seu R_f foi referido ao das hidrazonas do ácido pirúvico e do ácido alfa-cetaglutarico, usadas como referência.

A cromatografia em camada delgada (t.l.c.) foi utilizada neste trabalho, principalmente, para acompanhar o processo de metilação, usando-se placas de cromatofolhas Al de sílicagel (20x20 cm) (Merck) e, como solventes, foram utilizados os seguintes sistemas: (v/v) (h) benzeno-acetato de etila (20:1); (i) benzeno-etanol-água-ácido acético (200:47:15:1); (j) benzeno-acetato de etila-metanol (3:1:1); (k) benzeno-metanol (9:10); (l) clorofórmio-metanol (5:1); (m) acetató de etila-éter de petróleo-clorofórmio (3:2:1); (n) clorofórmio-etanol (9:1); (o) clorofórmio-metanol (50:1); (p) clorofórmio-etanol (12:1); (q) clorofórmio-etanol (4:1). Os açúcares foram visualizados com solução de ácido sulfúrico 10% em metanol (v/v), seguido de aquecimento em estufa à temperatura de 150°. A migração dos açúcares metilados foi relacionada à do 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-glucopirranose (R_g). Os acetados de alditóis parcialmente metilados foram visualizados com uma solução de molibdato de amônia 0,5% e sulfato

de cério 0,5% em etanol contendo ácido sulfúrico 0,5% (v/v), seguido de aquecimento em estufa a 150°.

A cromatografia em fase gasosa (g.l.c.) dos açúcares metilados foi realizada em cromatógrafo (modelo JCG-20K) da Jeol, com detector de ionização de chama, usando-se hélio como gás de arraste, com um fluxo de 45 ml/min. (as temperaturas da câmara de ionização e do detector eram de 200 e 280°, respectivamente). As colunas utilizadas foram as seguintes: (r) 14% (p/p) de LAC-4R-886 de 80-100 mesh sobre Chromosorb w (coluna de 100 x 0,4 cm d.i.) à temperatura de 136°; (s) 3% (p/p) de ECNSS-M sobre Chrom Q de 100-120 mesh (coluna 120 x 0,2 cm d.i.); (t) 3% (p/p) de OV-225 sobre Chrom de Q de 100-120 mesh (coluna de 120 x 0,2 cm d.i.) à temperatura de 170° ou com temperatura programada (130-180°), com uma variação de 4° por minuto. A coluna (r) foi usada para determinação quantitativa dos produtos de metanólise dos polissacarídeos metilados, sendo T relativo ao do metil-2,3,4,6-tetra-0-metil-β-D-glucopiranosídeo, e a composição molar foi calculada a partir da área registrada para cada componente através do método de triangulação de acordo com Stephen et al. (99). As colunas (s) e (t) foram utilizadas para a determinação quantitativa dos acetatos de alditóis e acetatos de alditóis parcialmente metilados, e seus tempos de retenção foram relacionados ao do xilitol pentacetato e 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol, respectivamente.

O açúcar total foi determinado pelo método fenol-

ácido sulfúrico (33) e açúcar redutor, pelo método Somogyi (95). A determinação quantitativa de proteínas foi realizada com o reagente de Folin-Ciocalteu segundo o método de Lowry et al. (76) e pelo processo de micro-Kjeldahl (68), usando-se o fator de conversão de 6,25 para converter nitrogênio protéico em proteína ($N_2 \times 6,25$).

Os ácidos urônicos foram dosados segundo o processo de Anderson e Cree (4) no hidrolisado ácido (ácido sulfúrico 1 *N* a 100°, durante 4 horas). O hidrolisado ácido foi passado em resina trocadora de íon [Dowex 50W X 8, 200-400 mesh (eluição com água) e Amberlite IR 4B (eluição com água e ácido acético 1 *N*)]. Foi realizado um experimento visando a estabelecer a percentagem de descarboxilação do ácido urônico durante o processo de hidrólise ácida (H_2SO_4 1 *N*, durante 4 horas a 100°). Também foi utilizado um tubo de referência, contendo *D*-galactose com o mesmo teor que os hidrolisados dos polímeros analisados, na tentativa de minimizar a interferência da *D*-galactose do hidrolisado nestas determinações.

O ácido fórmico foi dosado por titulação com hidróxido de sódio 0,01 *N*, em atmosfera de nitrogênio, de acordo com Baker e Somers (9). O ácido siálico foi determinado nos polímeros através de processos químicos, após uma hidrólise com ácido sulfúrico 0,1 *N*, durante uma hora à temperatura de 80°. Após neutralização com carbonato de bário, centrifugação e filtração, o hidrolisado foi desionizado em resina Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H^+ (eluição com água)

e Dowex 2 x 3, 200-400 mesh, forma acetato (eluição com água e ácido acético 1 *N*). O eluato ácido foi concentrado sob pressão reduzida à temperatura de 35° e no resíduo obtido foi dosado o ácido siálico, pelos processos descritos por Svennerholm (92) e de Warren (105). O ácido siálico também foi dosado no produto de hidrólise enzimática dos polímeros, utilizando-se a *N*-acetil-neuraminidase (Sigma) de acordo com o processo descrito por Brunetti (23).

O acetal do ácido pirúvico foi determinado nos polímeros originais F.A e F.B e ainda nos polímeros degradados da primeira (F.AD-1, F.BD-1), da segunda (F.AD-2 e F.BD-2) e da terceira (F.AD-3 e F.BD-3) degradação seqüenciada tipo Smith (55). O acetal do ácido pirúvico também foi determinado nas frações F.AC e F.AB de *M. cornuarietis* e na fucogalactana isolada de uma espécie de *Ampullarius* de Morretes, PR. Inicialmente, uma amostra de cada polímero (10 mg) foi submetida à hidrólise ácida com ácido oxálico 0,04 *N* (3 ml), durante 4 horas, a 100° em ampolas de vidro fechadas no bico de Bunsen. Após neutralização com carbonato de cálcio e filtração, o volume da solução foi completado para 10 ml com água destilada. Numa alíquota dessa solução, foi determinado o ácido pirúvico por método enzimático, usando-se desidrogenase láctica de músculo de coelho, tipo VII da Sigma. Foram usados os seguintes sistemas de incubação: a) tampão K_2HPO_4 KH_2PO_4 0,1 *N*, PH 7,4 0,5 ml, 5 μ l da solução de enzima diluída 1:20 com o tampão fosfato 0,1 *M* pH 7,4, 15 μ l de NADH a 1% e 0,3 ml

do hidrolisado; b) 0,5 ml do hidrolisado, 0,3 ml de trietanolamina 1 *N*, 15 μ l de NADH a 1% e 5 μ l de solução de desidrogenase láctica, diluída 1:20, segundo o método de Duckworth e Yaphe (34). O teor de ácido pirúvico foi expresso em percentagem (peso de ácido pirúvico em relação a um grama de hexose anidra) e em mol de ácido pirúvico por mol de hexose anidra.

O fósforo total foi pesquisado nas cinzas obtidas por tratamento de uma amostra de polissacarídeo com ácido sulfúrico e ácido nítrico concentrados e aquecimento apropriado, segundo o processo de Chen et al. (27).

O grupo sulfato foi determinado no hidrolisado - ácido (ácido fórmico 25%, durante 24 horas a 100°) dos polissacarídeos, na forma de complexo de benzidina-sulfato, segundo o processo descrito por Antonopoulos (6).

O grupo acetil nos polissacarídeos foi determinado na forma de complexo aceto-hidroxâmico pelo método de McComb e McCready (82) e expresso em percentagem (peso do ácido acético em relação a um grama de hexose anidra) e mol de ácido acético por mol de hexose anidra.

O conteúdo de éster metoxil nas galactanas foi determinado através do reativo de Hinton, de acordo com o método descrito por Schultz (91).

Para determinação das hexosaminas, os polímeros (10 mg de cada) foram submetidos à hidrólise ácida com ácido sulfúrico 6 *N* (1 ml) durante 8 horas a 100°. Após esfriamento, o volume foi completado para 10 ml com água destilada, e passado através de coluna Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H⁺, (coluna 10 x 1 cm d.i.). Após eluição com água (10 ml), a fim de eliminar as substâncias interferentes, as hexosaminas foram eluídas da coluna com ácido clorídrico 2 *N* e analisadas com o reagente de Elson-Morgan, segundo o processo descrito por Boas (15).

Para determinação do equivalente ácido dos polisacarídeos, estes foram previamente desacetilados por tratamento com hidróxido de sódio 0,01 *N*, durante 3 horas a 50°. Após diálise, em água corrente, por 72 horas, seguida de liofilização, os polímeros, quando testados pelo método de McComb e McCready (82), mostravam ausência do grupo acetil. Uma solução de polissacarídeo desacetilado (100 mg em 10 ml de água destilada) foi passada através de coluna de resina trocadora de íons Dowex 50W x 8, 25-50 mesh, forma H⁺, (coluna 30 x 2 cm d.i.), seguida de eluição com água. Os eluatos foram concentrados para um volume de 25 ml em evaporador rotatório a 50°. Uma alíquota do concentrado (20 ml) foi titulada com hidróxido de sódio 0,01 *N*, sob atmosfera de nitrogênio, usando-se como indicador a fenolftaleína. A solução restante (5 ml) foi utilizada para dosar o teor de açúcar total na amostra pelo método do fenol-ácido sulfúrico (33).

Os equivalentes ácidos foram referidos ao teor de açúcar anidro utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Eq = \frac{P \times 1000}{V \times N \times f}$$

Eq = equivalente

p = peso do açúcar anidro da amostra determinado pelo processo do fenol-ácido sulfúrico (33) e expresso em grama.

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio (0,01 N).

V = volume gasto da solução de hidróxido de sódio (0,01 N).

f = fator de correção da normalidade da solução de hidróxido de sódio.

O formaldeído liberado na oxidação do periodato foi determinado pelo método colorimétrico, como descrito por Vaskowsky e Ysay (103).

O peso seco dos polímeros foi obtido com amostras mantidas na estufa a 100°, até atingir peso constante. As cinzas foram determinadas em mufla à temperatura de 800°, até peso constante. O ponto de fusão do 2,4-dinitrofenilidrazona do piruvato extraído dos polissacarídeos de *P. lineata* e *M. cornuarietis* foi determinado com o aparelho HMK 69-268-L, usando-se termômetro de Anschütz da American Optical Company. Como referência, foram preparados derivados de 2,4-dinitrofenilidrazona de alfa-cetoglutarato e de piruvato, de acordo com o método descrito por Block (21).

PREPARAÇÃO DE β -D-GLUCOSE PENTACETATO

Uma amostra de *D*-glucose anidra (10 g) (Merck) foi acetilada com anidrido acético e acetato de sódio como catalisador, segundo o processo descrito por Wolfrom e Thompson (108). O produto cristalino (15 g) em etanol (3 vezes) apresentou ponto de fusão de 135° e $[\alpha]_D^{25} + 5^\circ$ (c, 0,5 em clorofórmio). Wolfrom e Thompson obtiveram ponto de fusão de 132° e $[\alpha]_D^{25} + 4^\circ$ (clorofórmio) para o pentacetato de β -*D*-glucopiranosose. Uma amostra de pentacetato de β -*D*-glucopiranosose (0,5 g) foi metilada três vezes em solução de tetraidrofurano (25 ml) com sulfato de metila (6 ml) e hidróxido de sódio pulverizado (seco a 70° sob pressão reduzida, em aparelho de Abderhalden), de acordo com o processo de Adams e Bishop (1). Após neutralização com ácido acético glacial, à temperatura de 0-2°, o produto foi extraído com clorofórmio e lavado com água destilada (6 vezes) em funil separador. O xarope obtido, após evaporação do solvente (evaporador rotatório sob pressão reduzida a 25°), foi fracionado em coluna (30 x 20 cm d.i.) de sílica gel, 60-120 mesh (Merck), utilizando-se como eluente uma mistura de clorofórmio-metanol 5:1 (1 litro). Purificação posterior da fração foi realizada por t.l.c. preparativa em placa de sílica gel, usando-se o solvente (i). A sílica gel, contendo o produto, foi removida da placa e tratada com clorofórmio e filtrada em funil de placa porosa para eliminar a sílica gel. O produto metilado apresentou $[\alpha]_D^{25} + 25^\circ$ (c, 0,1 em água). Bell (14)

obteve $[\alpha]_D^{25} + 18,7^\circ$ para metil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil- β -*D*-glucopiranosídeo, contendo traços do α -isômero correspondente.

PREPARAÇÃO DE XILITOL PENTACETATO

Uma amostra de *D*-xilose (0,5 g) dissolvida em 50 ml de água destilada e tratada com um excesso de boridreto de sódio (1 g) à temperatura ambiente, até a reação ser negativa para açúcar redutor (Somogyi-iodométrico). O excesso de boridreto de sódio foi eliminado da preparação por tratamento com ácido acético 2 *N*. Após tratamento com resina trocadora de cátion (Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H^+), o ácido bórico resultante foi eliminado da preparação por co-destilação com metanol. O xilitol, assim obtido, foi seco sob pressão reduzida (aparelho de Abderhalden) e em seguida acetilado com anidrido acético e acetato de sódio como catalisador, segundo o processo descrito por Wolfrom e Thompson (99). O produto, cristalizado em etanol (3 vezes), apresentou ponto de fusão de 60° . Hough e Richardson (63) obtiveram ponto de fusão de 60° para xilitol pentacetato. Essa preparação, quando analisada por cromatografia em papel (solvente d), e g.l.c. (colunas s e t) demonstrou a presença - apenas de um componente, com migração no papel e *T* semelhante ao do xilitol pentacetato.

PREPARAÇÃO DE GALACTITOL HEXACETATO

Uma amostra de *D*-galactose (1 g) foi reduzida com boridreto de sódio (2 g) e, após tratamento apropriado, como descrito anteriormente, foi acetilado com anidrido acético e acetato de sódio. A preparação demonstrou apenas um componente, quando analisado por cromatografia em papel (solvente j), por cromatografia em camada delgada (solvente h) e por g.l.c. (colunas s e t). O produto cristalizado em etanol - (3 vezes) apresentou ponto de fusão de 169°. Hough e Richardson (63) obtiveram ponto de fusão de 168° para o galactitol - hexa cetato.

PREPARAÇÃO DE 1,5-DI-*O*-ACETIL-2,3,4,6-TETRA-*O*-METIL-*D*-GLUCITOL

Uma amostra de metil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-β-*D*-glucopiranosídeo (100 mg) foi tratada com ácido clorídrico 0,5 *M* (10 ml) durante 4 horas à temperatura de 100°. Após neutralização com hidróxido de sódio, o material metilado foi extraído com clorofórmio e lavado com água em funil de separação. O xarope obtido após evaporação do solvente foi cromatografado em coluna de sílica gel (Merck), usando-se uma mistura de clorofórmio-metanol 5:1 (1 litro) como eluente. Uma fração eluída da coluna, principal componente apresentou $[\alpha]_D^{25} + 124^\circ + 112^\circ$. Duarte e Jones (31) obtiveram o valor de $[\alpha]_D^{25} + 108^\circ$ para o 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-glucose.

A fração eluída da coluna (50 mg) foi reduzida com boridreto de sódio como já descrito e, em seguida, acetilada com uma mistura de anidrido acético-piridina 1:1 (1 ml) durante 12 horas à temperatura ambiente, seguido de aquecimento (100°) durante 10 minutos. Análise por t.l.c. (solvente m) e g.l.c. (coluna t) demonstrou a presença de um único componente (1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-glucitol).

PREPARAÇÃO DO DERIVADO 2,4-DINITROFENILIDRAZONA DO ACETAL DE ÁCIDO PIRÚVICO EXTRAÍDO DOS POLISSACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *P. lineata* e *M. cornuarietis*.

O acetal de ácido pirúvico foi liberado das frações de polissacarídeos (1,0 g) por tratamento com ácido oxálico 0,04 *N* (250 ml) durante 4 horas a 100°, de acordo com o método descrito por Duckworth e Yaphe (34). Após neutralização do ácido com carbonato de cálcio (pH 7,0) e centrifugação, o sobrenadante foi passado através de coluna (30 x 2 cm d.i.) de resina trocadora de íons (Dowex 1 x 8, 200-400 mesh, forma acetato). A fração neutra foi eluída da coluna com água destilada até reação negativa com o reagente fenol-ácido sulfúrico (33). A fração ácida foi eluída da coluna com ácido acético 2 *N* (3 vezes o volume da coluna). Esta fração foi concentrada sob pressão reduzida para o volume de 5 ml, ao qual foi adicionada solução de 2,4-dinitrofenilidrazina 0,5% em ácido clorídrico 6 *N* (5 ml) para obtenção do derivado -

coletados na região do Pantanal do Mato-Grosso do Sul. Os polissacarídeos isolados da glândula de albúmen de *M. cornuarietis* foram submetidos ao mesmo processo de purificação descrito para os polissacarídeos da glândula de albúmen *P. lineata*, utilizando-se base quaternária em pH 7,0 e em pH 8,5 (tampão borato). Duas frações também foram obtidas da glândula de albúmen de *M. cornuarietis*, as quais foram denominadas de F.AC (pH 7,0) e F.BC (pH 8,5), cujos rendimentos em polissacarídeo (peso seco) foram respectivamente, de 8,4% (1,9 g) e 3,5% (0,8 g), quando relacionados ao pó cetônico das glândulas de albúmen.

O polissacarídeo (fucogalactana, F.G.) isolado de uma espécie de *Ampullarius* sp. coletada em Morretes, PR. foi purificada por Feijó e Duarte (39) pela precipitação fracionada com brometo de hexadeciltrimetilamônia em presença de tampão borato pH 8,5. Uma amostra deste polímero nos foi cedida pelos autores para ser investigada no que concerne ao teor de acetal de ácido pirúvico.

HIDRÓLISE ÁCIDA DOS POLÍMEROS ISOLADOS DE GLÂNDULAS DE ALBÚMEN DE *P. lineata*.

Uma amostra (50 mg) de cada polissacarídeo das frações F.A e F.B foi hidrolisada com ácido sulfúrico 1 *N* (5 ml) durante 4 horas, à temperatura de 100° em ampola de vi

dro, fechada no bico de Bunsen. A solução ácida foi tratada com carbonato de bário (pH 4,5) e o filtrado foi concentrado sob baixa pressão a 40° (evaporador rotatório) até um volume de \sim 5 ml. Essa fração foi desionizada pela passagem sequencial em coluna (10 x 1 cm d.i.) de íons de Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H^+ e Amberlite IR-4B, 25-50 mesh, forma OH^- , usando-se água como eluente. A solução desionizada foi concentrada sob pressão reduzida (evaporador rotatório) a um volume de \sim 1 ml. Os produtos de hidrólise ácida das frações F.A e F.B foram analisados por cromatografia descendente em papel Whatman nº 1 (p.c.) (solvente a) e visualizados com nitrato de prata alcalina (101) e cloridrato de *p*-anisidina (67), que revelaram apenas a presença de um componente de migração semelhante a *D*-galactose. Análise por cromatografia em papel (solvente j) dos hidrolisados ácidos das frações F.A e F.B, sem prévio tratamento com resinas trocadoras de íons, demonstrou, em adição à hexose, um componente de R_{Gal} de 0,05 que era visualizado por nitrato de prata alcalino e por *o*-fenilenidiamina de acordo com o processo de Weiland, descrito por Block (21).

Uma amostra das frações F.A e F.B (1 g de cada fração) foi hidrolisada com ácido sulfúrico 1 *N* como descrito anteriormente. Após neutralização com carbonato de bário e centrifugação, os produtos de hidrólise ácida de cada fração foram passados através de uma coluna (30 x 2 cm d.i.) de carvão-celite (2:1, p/p) e eluídas com água. A rotação ótica do eluato aquoso das frações F.A e F.B era de $[\alpha]_D^{25} + 79^\circ$

(c, 0,3 em água). Parte do eluato aquoso (~ 100 mg de cada fração) foi concentrada a xarope e o produto cristalizado em etanol apresentava uma rotação ótica de $[\alpha]_D^{25} + 80,5^\circ$ (c, 0,25 em água) para ambas as frações.

Uma amostra do eluato aquoso das frações F.A e F.B (~ 100 mg de cada fração) foi tratada com um excesso de boridreto de sódio com a finalidade de converter o monossacarídeo no alditol correspondente. A reação foi interrompida com ácido acético 2 N e o ácido bórico resultante foi eliminado da preparação na forma de borato de metila pelo processo convencional já descrito. O acetato de alditol, cristalizado em etanol, apresentava em cromatografia em camada delgada uma migração semelhante ao do galactitol hexacetato, (solvente h), e apresentou ponto de fusão de 171-172°; Duarte e Jones (31) obtiveram o valor de 169° para galactitol hexacetato.

HÍDRÓLISE ÁCIDA DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DA GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *M. cornuarietis*

As frações F.AC e F.BC da glândula de albúmen de *M. cornuarietis* foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 1 N (10 mg de cada polissacarídeo com 1 ml de solução ácida) durante 4 horas, à temperatura de 100°, em ampolas de vidro fechadas em bico de Bunsen. O hidrolisado ácido de cada fra-

ção foi tratado com carbonato de bário centrifugado, e os respectivos sobrenadantes foram desionizados após tratamentos sucessivos em coluna (10 x 1 cm d.i.) de resinas trocadoras de íons (Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H^+ e Amberlite IR-4B, 25-50 mesh, forma OH^-). Os açúcares foram eluídos dessas colunas com água. Após concentração dos eluatos sob pressão reduzida (evaporador rotatório), os produtos de hidrólise ácida de F.AC e F.BC foram analisados por cromatografia descendente em papel Whatman nº 1 (solvente a), (visualização com nitrato de prata alcalino e *p*-anisidina. Essa análise revelou a presença de dois componentes com migração semelhante à da *D*-galactose e da *L*-fucose, usados como açúcar de referência.

REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE GLÂNDULAS DE ALBÚMEN DE *P. lineata* e *M. cornuarietis*

Uma amostra das frações F.A e F.B (20 mg de cada polissacarídeo) foi hidrolisada com ácido sulfúrico 1 *N*, neutralizada com carbonato de bário e desionizada com resinas trocadoras de íons, segundo os processos já descritos anteriormente. Os açúcares redutores de cada amostra foram reduzidos com um excesso de boridreto de sódio (50 mg), à temperatura ambiente por 6 horas. Após esse período de redução, o excesso de boridreto de sódio foi eliminado através da adi

ção de ácido acético 2 N. Para eliminar o cátion (sódio) de cada preparação utilizou-se coluna (10 x 1 cm d.i.) de resina trocadora de cátion, Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H^+ . Os eluentes aquosos eluídos da coluna foram concentrados em evaporador rotatório a 40° até secura. O ácido bórico formado a partir desse tratamento foi eliminado na forma de borato de metila por co-destilação (8 vezes) com metanol (10 ml).

Os alditóis resultantes foram submetidos à acetilação com 1 ml de uma mistura de piridina-anidrido acético numa relação de 1:1 (v/v), à temperatura ambiente por 12 horas, sendo o processo de acetilação interrompido pela adição de uma mistura de gelo e água. Os acetatos de alditóis foram extraídos da solução aquosa com clorofórmio, utilizando-se funil de separação. A solução clorofórmica foi exaustivamente lavada com água (8 vezes) e, em seguida, o clorofórmio foi eliminado de cada preparação por destilação, sob pressão reduzida a 40°. A piridina residual de cada preparação foi eliminada por co-destilação com tolueno, sob pressão reduzida.

Os acetatos de alditóis de F.A e F.B foram analisados por g.l.c. (coluna t), demonstrando a presença de apenas um componente em cada fração de $T = 2,1$, relativo ao xilitol pentacetato, que foi utilizado como padrão interno. Esse valor de T era compatível com o do galactitol hexacetato.

Uma amostra de cada fração de polissacarídeo de

glândula de albúmen de *M. cornuarietis* (F.AC e F.BC) (20 mg) foi hidrolisada com ácido sulfúrico 1 N, reduzida com boridreto de sódio e acetilada, de acordo com os processos já descritos.

A análise por g.l.c. de cada amostra na forma de acetato de alditol (coluna t) demonstrou a presença de dois componentes na F.AC e F.AB de $T = 0,6$ e $T = 2,1$ com relação ao xilitol pentacetato, utilizado como padrão interno. Esses valores de T eram compatíveis com os de L-fucitol pentacetato e de galactitol hexacetato.

DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DA D-GALACTOSE NOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS POLISSACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *P. lineata* e *M. cornuarietis*

Para a determinação de D-galactose nos polissacarídeos de *P. lineata* e de *M. cornuarietis*, 10 mg de cada amostra (F.A, F.B, F.AC e F.BC) foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 1 N, durante 4 horas a 100°. Após tratamento com hidróxido de bário e desionização por resina trocadora de íons (Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H⁺), os hidrolisados foram submetidos à análise enzimática. A enzima utilizada foi a D-galactose oxidase de *Dactylium dendroides*, com o seguinte sistema de incubação: 200 µg de D-galactose oxidase, 1,6 ml de O-dianisidina-peroxidase (reagente cromogênico) e

0,4 ml de hidrolisado, contendo de 20 a 30 μg de açúcar redutor de acordo com a técnica descrita por Amaral et al.(3). O sistema de incubação foi mantido a 37° por 60 minutos. A absorbância foi determinada em 420 nm, utilizando-se padrões que variavam de 18 a 54 μg de *D*-galactose. Nas frações F.A, F.B, F.AC e F.BC toda galactose (previamente dosada pelo reagente fenol-ácido sulfúrico) foi transformada em galacto-hexodialdose.

DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DA *L*-GALACTOSE E *L*-FUCOSE NOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS POLISSACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *P. lineata* e *M. cornuarietis*.

A enzima *L*-fucose desidrogenase obtida de células de *Pullularia pullulans* (50) foi utilizada para determinação da *L*-galactose e *L*-fucose, nos produtos de hidrólise ácida das frações F.A, F.B, F.AC e F.BC, em virtude de sua especificidade para esses açúcares. O sistema de incubação para a determinação da *L*-galactose e *L*-fucose foi o seguinte: 50 μ moles de tampão glicina/hidróxido de sódio, pH 10,0; 3 μ moles de NAD^+ , 0,1 a 0,2 unidades de enzima purificada, 0,1 a 0,2 ml do hidrolisado ácido dos polissacarídeos (25 a 50 μg de hexose), sendo o volume total do sistema de 1 ml. A determinação da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro 635 D da Varian, a 340 nm com a temperatura termostatizada a $30 \pm 0,1^\circ$. No hidrolisado das frações F.A e F.B,

nenhuma atividade enzimática foi observada, e quanto às frações F.AC e F.BC foi verificada uma variação na absorvância correspondente a 8% do açúcar total, compatível com a presença de *L*-fucose nesses polissacarídeos.

DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ANOMÉRICA DAS UNIDADES DOS POLISACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *P. lineata* PELO PROCESSO DE OXIDAÇÃO COM TRIÓXIDO DE CROMO.

Uma amostra da fração F.A e F.B (100 mg) de cada fração foi dissolvida em formamida (5 ml) e acetilada com uma mistura de anidrido acético-piridina numa relação de (v/v) - 4:3 à temperatura ambiente, durante 24 horas. A reação foi interrompida por adição de água gelada, e a mistura de reação foi dialisada contra água corrente, por 24 horas. A fração não dialisável foi liofilizada e os polímeros acetilados foram submetidos à oxidação com trióxido de cromo, de acordo com o processo descrito por Hoffman et al. (61). As frações F.A e F.B acetiladas foram adicionados ácido acético glacial (10 ml), trióxido de cromo (400 mg) e xilitol pentacetato (20 mg) como padrão interno. A mistura de reação foi colocada em banho-maria a 50°, e alíquotas foram removidas em diferentes intervalos de tempo (0, 12, 24 e 36 horas). Essas alíquotas foram tratadas com água (0-2°) para interromper o processo de oxidação, e a solução aquosa de cada amostra foi transferida para funil de separação e extraída com clorofór-

mio. O solvente foi tratado com sulfato de sódio anidro e o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida à temperatura de 35°. Em seguida, o resíduo foi tratado com ácido sulfúrico 1 *N*, em ampola de vidro por 4 horas, a 40°, seguido de tratamento com carbonato de bário (pH 4,5). O filtrado foi passado em coluna (20 x 2 cm d.i.) de resina trocadora de íons (Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H⁺) (~ 20 ml), seguido de redução com boridreto de sódio e acetilação com uma mistura de piridina-anidrido acético 1:1 (v/v), como já descrito. Os acetatos de alditóis, obtidos das amostras de 0, 12, 24 e 36 horas de oxidação, foram analisados por g.l.c. (coluna t) e quantificados em relação ao padrão interno.

CONSUMO DE META-PERIODATO E ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO DOS POLISSACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *P. lineata*.

A determinação do consumo de meta-periodato e ácido fórmico foi realizada nas amostras F.A e F.B originais e desacetiladas. O processo de desacetilação desses polímeros foi semelhante ao descrito anteriormente (ver determinação do equivalente ácido dos polissacarídeos). Uma amostra de F.A e F.B originais e desacetiladas (75 mg de cada fração) foi submetida à oxidação com meta-periodato de sódio 0,05 *M* (150 ml), na ausência de luz, durante 96 horas, à temperatura de 0-2°. Alíquotas de 1 ml das soluções oxidantes foram retiradas em intervalos de tempo diferentes para determinar o

consumo de periodato (83) e o teor de ácido fórmico liberado (5). Após 96 horas de reação, o excesso de meta-periodato foi eliminado pela adição de etileno glicol (5 ml). A solução contendo o polissacarídeo oxidado foi colocada em diálise contra água corrente, por 12 horas. Após diálise, o volume de solução contendo o polissacarídeo oxidado foi reduzida em evaporador rotatório até \sim 10 ml, sendo seguido de tratamento com boridreto de sódio (150 mg) durante 12 horas. - Após eliminação do excesso de boridreto de sódio por tratamento com ácido acético 2 *N*, a solução contendo o polissacarídeo reduzido foi submetido novamente à diálise contra água corrente, durante 12 horas.

Com a finalidade de averiguar a eficiência da oxidação do polissacarídeo, duas amostras de cada polissacarídeo, previamente oxidado, foram reinvestigadas; uma foi novamente oxidada com meta-periodato de sódio e a outra foi submetida a uma sequência de reações envolvendo redução com boridreto de sódio e oxidação com meta-periodato de sódio, de acordo com sugestões descritas por Painter (86) e Goldstein et al (45). Nenhum aumento significativo foi observado no consumo do meta-periodato em ambos os experimentos.

O valor do consumo de meta-periodato de cada polissacarídeo foi extrapolado para o tempo zero, utilizando-se para tal fim uma curva de oxidação do polímero (tempo contra moles de meta-periodato consumido por mol de hexose anidra).

O cálculo do consumo de meta-periodato foi determinado através das seguintes fórmulas:

$$1) \quad M = \frac{(B-A) \times N \text{ do tiosulfato de s\u00f3dio}}{\text{ml da al\u00edquota} \times 2}$$

onde:

M = molaridade da solu\u00e7\u00e3o oxidante

A = ml de tiosulfato de s\u00f3dio 0,01 N gastos na titula\u00e7\u00e3o do meta-periodato, da solu\u00e7\u00e3o contendo polissacar\u00eddeo.

B = ml de tiosulfato de s\u00f3dio 0,01 N gastos na titula\u00e7\u00e3o do meta-periodato, da solu\u00e7\u00e3o sem polissacar\u00eddeo.

$$2) \quad \frac{\text{moles de meta-periodato consumido}}{\text{mol de hexose anidra}} =$$

$$= \frac{\text{volume total de solu\u00e7\u00e3o oxidante} \times M \times 162}{\text{grama de polissacar\u00eddeo} \times 1000}$$

O grama de polissacar\u00eddeo foi dosado pelo m\u00e9todo de fenol \u00e1cido sulf\u00fabrico.

O \u00e1cido f\u00f3rmico liberado nos sistemas de oxida\u00e7\u00e3o foi determinado por titula\u00e7\u00e3o com hidr\u00f3xido de s\u00f3dio 0,01 N, sob atmosfera de nitrog\u00eanio, de acordo com o processo descrito por Baker e Samers (9), usando-se a seguinte f\u00f3rmula para o c\u00e1lculo do teor de \u00e1cido liberado por mol de hexose anidra:

$$x = \frac{\text{vol. da solução oxidante} \times \text{vol. de NaOH} \times N \times 1000}{\text{grama de polissacarídeo} \times \text{ml da amostra} \times 1000}$$

Na determinação do ácido fórmico não foi considerada a percentagem de ácido pirúvico.

CONSUMO DE META-PERIODATO E ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO DOS POLÍMEROS DE *M. cornuarietis*.

O consumo de meta-periodato e ácido fórmico liberado nos polímeros de *M. cornuarietis* foi determinado pelos métodos descritos para os polissacarídeos de *P. lineata*. Para esse fim, utilizou-se uma solução de meta-periodato de sódio 0,05 M, na proporção de 100 ml para cada amostra de fração F.AC (50 mg) e F.BC (50 mg).

ANÁLISE TIPO SMITH DOS GRUPOS TERMINAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata*.

Uma amostra dos polissacarídeos isolados da glândula de albúmen de *P. lineata* (F.A e F.B, 20 mg de cada fração) foi submetida à oxidação com meta-periodato de sódio 0,05 M (50 ml), durante 96 horas à temperatura de 0-2°, na ausência de luz. O excesso do oxidante nessa reação, foi destruído pela adição de etileno glicol e, após diálise con-

tra água corrente (12 horas), a solução contendo o polissacarídeo foi concentrada a xarope, sob pressão reduzida, a 40°, em evaporador rotatório. Os polialdeídos não dialisáveis foram suspensos em água (10 ml) e reduzidos com boridreto de sódio (55) (40 mg), durante 12 horas à temperatura ambiente. O agente redutor foi eliminado por adição de ácido acético 2 N, seguido de diálise contra água corrente, durante 12 horas. As soluções contendo os polissacarídeos foram concentradas em evaporador rotatório a 40°, até secura. Os poliálcoois assim obtidos foram submetidos à hidrólise ácida com ácido sulfúrico 1 N durante 4 horas à temperatura de 100°. Depois de esfriadas, as soluções foram tratadas com carbonato de bário (pH 4,5), centrifugadas e filtradas. Os hidrolisados ácidos foram desionizados por passagem em coluna (10 x 1 cm d.i.) de resina trocadora de íons (Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H⁺), seguidos de eluição com água destilada, até o eluato não demonstrar reatividade ao teste de fenol-ácido sulfúrico (33). O eluato de cada coluna foi concentrado sob pressão reduzida ao volume de ~ 15 ml em evaporador rotatório. A análise cromatográfica (cromatografia em papel, solvente a) dos produtos de hidrólise ácida das frações de poliálcoois correspondentes de F.A e F.B, demonstrou, quando visualizados pelo reagente nitrato de prata alcalino (101), apenas dois componentes, os quais eram compatíveis com a migração de D-galactose e glicerol, usados como referência.

Uma amostra dos produtos de hidrólise ácida das frações de poliálcoois correspondentes de F.A e F.B foi tratada

da com boridreto de sódio por 6 horas e o excesso do agente redutor foi destruído com ácido acético 2 N. O íon sódio foi eliminado por resina trocadora de cátion (Dowex 50W x 8, 200-400 mesh, forma H⁺) e o ácido bórico formado foi eliminado por co-destilação com metanol (4 x 5 ml). Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura (v/v) de piridina-anidrido acético 1:1. Os acetatos de alditóis resultantes foram extraídos com clorofórmio em funil de separação, sendo o solvente evaporado em evaporador rotatório a 35°. Os acetatos de alditóis foram analisados por g.l.c. (coluna t), com temperatura programada de 130-180°, com uma variação de 4° por minuto.

ANÁLISE TIPO SMITH DOS GRUPOS TERMINAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE *M. cornuarietis*.

Uma amostra (10 mg) de cada polímero (F.AC e F.BC) foi submetida à oxidação com meta-periodato de sódio 0,05 M (45) (25 ml), na ausência de luz, à temperatura de 0-2°, por 96 horas. Após tratamento com boridreto de sódio, seguido de hidrólise ácida com ácido sulfúrico 1 N por 4 horas a 100° as frações F.AC e F.BC, foram analisadas por cromatografia em papel (solvente a) e visualizadas com o reagente nitrato de prata alcalino. A análise cromatográfica dos hidrolisados ácidos das frações de poliálcoois correspondentes de F.AC e F.BC demonstrou a presença de componentes, com migração compa

tível com a de *D*-glucose, *L*-fucose e glicerol, usados como referência. Uma amostra do hidrolisado ácido de cada fração (F.AC e F.BC) foi tratada com boridreto de sódio e as preparações livres de ácido bórico (co-destilação com metanol) foi acetilada com piridina e anidrido acético e os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por g.l.c. (coluna t).

DEGRADAÇÃO SEQUENCIADA TIPO SMITH DOS POLÍMEROS DE *P. lineata*

O processo de degradação sequenciada tipo Smith, utilizada para os polímeros de *P. lineata*, é semelhante àquela descrito por Diaz-Segura e Duarte (29) para galactana isolada de glândula de albúmen de *S. oblongus*.

As frações F.A (10 mg) e F.B (9 mg) foram inicialmente submetidas ao processo de oxidação com meta-periodato de sódio 0,05 M (2 litros) nas mesmas condições descritas anteriormente (ver consumo de periodato). Após 104 horas de oxidação, as soluções contendo o polissacarídeo foram dialisadas por 24 horas, contra água corrente. As soluções contendo os polímeros não dialisáveis foram concentradas (200 ml) em evaporador rotatório e, em seguida, tratadas com boridreto de sódio e os poliálcoois livres de ácido bórico assim obtidos foram reoxidados com meta-periodato de sódio 0,02 M, durante 30 horas. O consumo de periodato durante o segundo processo de oxidação apresentou um aumento significativo (0,02 moles de meta-periodato de sódio por mol de hexose anidra).

Após o segundo processo de oxidação, as frações F.A e F.B foram tratadas com boridreto de sódio (15 e 12 g, respectivamente) durante 12 horas, e, após destruir o excesso do agente redutor com ácido acético, as soluções foram submetidas à diálise contra água corrente durante 24 horas.

As soluções contendo os poliálcoois foram concentradas a um xarope e, em seguida, submetidas à hidrólise ácida branda com ácido sulfúrico 0,5 M (2 litros), à temperatura ambiente (18-25°), por 60 horas. Após diálise contra água destilada (5 x 4 litros), em sistema fechado, as soluções contendo os produtos não dialisáveis foram concentrados (500 ml), sob baixa pressão, à temperatura de 35-40°. Uma alíquota de ~ 5 mg foi removida de cada fração e hidrolisada com ácido sulfúrico 1 N por 4 horas, a 100° em ampolas de vidro, fechadas no bico de Bunsen. Após neutralização com carbonato de bário, redução com boridreto de sódio e acetilação com piridina e anidrido acético, a análise desses produtos por g.l.c. (coluna t), demonstrou a presença de galactitol (maior componente) e traços de glicerol. A presença de glicerol nesses hidrolisados ácidos sugere que o tempo de hidrólise ácida suave dos polissacarídeos foi insuficiente (60 horas) para remoção completa dos álcoois (glicerol) originados durante o processo degradativo. Por isso, o polissacarídeo obtido da primeira degradação (fração não dialisável), foi submetido novamente à hidrólise ácida suave (H_2SO_4 0,5 M, 1 litro) à temperatura ambiente, por mais 30 horas. Após esse período, o hidrolisado das duas frações (F.A e F.B) foi dialisado contra água desti

lada (sistema fechado 5 x 4 litros) e uma amostra de cada fração não dialisável, quando hidrolisada com H_2SO_4 1 N, 100°, 4 horas, demonstrou apenas galactose, quando analisada na forma de acetato de alditol, por g.l.c. (coluna t). Desse modo, o período de 90 horas foi considerada satisfatório para liberação completa dos álcoois desses polímeros. Após liofilização, a fração não dialisável (F.A e F.B) apresentou rendimento 55% (5,5 g) e 50% (4,5 g), respectivamente, em relação aos polímeros originais.

A porção dialisável das duas frações (F.A e F.B) foi tratada com carbonato de bário (pH 4,5) e filtrada. Após concentração sob pressão reduzida até um xarope, depois de dissolvidas em água destilada (20 ml), essas duas frações (F.A e F.B) foram fracionadas em resina trocadora de íons (Dowex 50W 1 x 8, 200-400 mesh, forma acetato, (coluna 30 x 3 cm d. i.), sendo os açúcares neutros eluídos com água, enquanto os açúcares ácidos foram eluídos com ácido acético 2 N. Os eluatos das frações (F.A e F.B), contendo os açúcares ácidos foram concentrados sob pressão reduzida (evaporador rotatório), à temperatura de 35-40° até um xarope.

A fração contendo os açúcares neutros, bem como a fração contendo açúcares ácidos provenientes do fracionamento de F.A e F.B (5 mg de cada), foi tratada com ácido oxálico 0,04 N (3 ml) durante 4 horas, a 100°. Após neutralização com carbonato de cálcio anidro (pH 7,0) e centrifugação, os volumes dos sobrenadantes de cada fração foram completados

para 5 ml para determinação de ácido pirúvico pela desidrogenase láctica (34). Na fração contendo açúcares neutros, não foi detectado ácido pirúvico, enquanto as frações de açúcares ácidos, provenientes de F.A e F.B, apresentaram um teor de ácido pirúvico de 3,5 mg% e 3,6 mg%, respectivamente.

Os polissacarídeos recuperados da primeira degradação (F.AD-1, 5,5 g e F.BD-1, 4,5 g) foram submetidos a reações sucessivas de oxidação com meta-periodato, redução com boridreto de sódio e hidrólise ácida suave, como descrito anteriormente. Desse modo, obtiveram-se as frações F.AD-2 com rendimento de 20% (2,0 g) e F.BD-2 com rendimento de 21% (1,9 g) em relação aos polímeros originais. As frações F.AD-2 (2,0 g) e F.BD-2 (1,9 g) foram submetidas à oxidação com meta-periodato de sódio, seguidas de redução com boridreto de sódio e hidrólise ácida suave, como já descrito. Após essa terceira etapa degradativa das frações F.A e F.B, recuperaram-se as respectivas frações de polissacarídeos, F.AD-3 com rendimento de 6,5% (0,65 g) e F.BD-3 com rendimento de 6,6% (0,6 g) em relação aos polímeros originais.

Os polissacarídeos obtidos da primeira, segunda e terceira degradações seqüenciadas tipo Smith, das frações F.A e F.B de *P. lineata* (F.AD-1, F.AD-2, F.AD-3 e F.BD-1, F.BD-2 e F.BD-3) foram submetidos à oxidação com periodato de sódio, análise dos grupos terminais tipo Smith e metilação. A análise de metilação dessas frações foram realizadas antes e, após remoção do ácido pirúvico, as frações dos polissacarí-

deos foram despiruviladas com ácido oxálico 0,04 *N* a 100°, durante 4 horas, numa relação de 1 g de polissacarídeo para 250 ml da solução ácida.

INVESTIGAÇÃO SOBRE A CONFIGURAÇÃO ACETÁLICA DO ÁCIDO PIRÚVICO EM POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata*, DE ACORDO COM O PROCESSO DESCRITO POR SLONEKER E ORENTAS. (94)

Uma amostra das frações de polissacarídeos F.A e F.B (1 g de cada) foi oxidada com meta-periodato de sódio, seguido de redução com boridreto de sódio e hidrólise ácida com ácido sulfúrico 0,25 *M*, por 60 horas, à temperatura ambiente, segundo processo descrito por Sloneker e Orentas (94) para determinação da configuração acetálica do ácido pirúvico em polissacarídeos (ácido pirúvico ligado a 0-4 e 0-6 das unidades de *D*-galactose). Após diálise, a fração dialisável foi tratada com carbonato de bário e o filtrado foi desionizado com resina trocadora de íon (Dowex 50W x 8, 200 - 400 mesh, forma H⁺). A solução livre de carbonato foi liofilizada e o resíduo dissolvido em água (5 ml) foi passado através de coluna (30 x 3 cm d.i.) de resina trocadora de íon (Dowex 1 x 8, 200 - 400 mesh, forma acetato, a qual foi eluída com água destilada, até não apresentar reatividade ao teste de fenol-ácido sulfúrico (33). Em seguida, a coluna foi tratada com ácido acético 1 *N* (250 ml) e 2 *N* (250 ml) e os eluatos ácidos foram reunidos e concentrados sob pressão reduzida à temperatu-

ra de 30-35°. O sedimento obtido foi tratado com ácido sulfúrico 1 *N*, durante 3 horas e à temperatura de 100°. O hidrolisado foi tratado com carbonato de bário e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e passado através de coluna (20 x 1 cm d.i.) de resina trocadora de íon (Dowex 1 x 8, 200 - 400 mesh, forma acetato), sendo a eluição com água destilada seguida de eluição com ácido acético 2 *N*. O eluato aquoso foi liofilizado e o resíduo foi tratado com boridreto de sódio, seguido de acetilação por método convencional. Apenas galactitol hexacetato foi detectado no produto de reação, quando analisado por g.l.c. (coluna t).

No eluato ácido, foi demonstrada a presença de ácido pirúvico quando analisado por cromatografia em papel (solvente e) e visualização com orto-fenilenodiamino e teste enzimático com desidrogenase láctica.

METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata*

A análise de metilação dos polissacarídeos ácidos de glândula de albúmen de *P. lineata* foi realizada em amostras com e sem remoção de acetal de ácido pirúvico de F.A e F.B (0,5 g de cada fração) bem como de F.AD-1, F.AD-2, F.AD-3, F.BD-1, F.BD-2 e F.BD-3 (100 mg de cada fração) foi dissolvida em água (~ 20 ml) e tratadas com solução de boridreto de sódio 0,2 *M*, a fim de reduzir a extremidade redutora desses

polímeros. Durante o processo de redução, foi utilizado ácido bórico, a fim de acertar o pH dessas soluções entre 9 e 9,5. O excesso de boridreto de sódio foi destruído com ácido acético 2 *N* e; após diálise, as soluções contendo os polissacarídeos foram liofilizadas. Este tratamento (redução com boridreto de sódio) visa a diminuir os prováveis efeitos de beta-eliminação, que possam ocorrer durante os processos de metilação.

Os polissacarídeos dissolvidos em água destilada foram tratados com sulfato de metila e hidróxido de sódio a 40%, numa relação de 1:2 (v/v), segundo o processo descrito por Haworth (54): Ambas as soluções foram acrescentadas gota a gota (50 ml de hidróxido de sódio a 40% por grama de polissacarídeo) e mantidas sob agitação constante (agitador magnético), durante 3 horas. Acetona era acrescentada (quando necessário) às soluções metilantes, a fim de evitar a insolubilidade dos polissacarídeos parcialmente metilados. Após manter as soluções metilantes sob agitação constante por mais 5 horas, elas foram neutralizadas, inicialmente, com ácido sulfúrico 6 *N*, e, posteriormente, com ácido acético, 2 *N* até pH 7,0 conservando-se a temperatura das soluções de 0-29.

Após diálise, as frações não dialisáveis foram liofilizadas e apresentaram um rendimento em polissacarídeo que varia de 92 a 94%, quando testado pelo método fenol-ácido sulfúrico (33).

Esse processo de metilação foi realizado em sistema fechado, consistindo em um balão de três bocas esmerilhadas (24 x 40), nas quais foram inseridos três funis de separação com tubo de equilíbrio de pressão (Kimble Products, Illinois, U.S.A., juntas de 24 x 40). Esses funis foram usados para dar vazão à solução alcalina, sulfato de metila e acetona, respectivamente, durante o processo de metilação. Todo o processo de metilação foi realizado em capela com atmosfera de hidróxido de amônia. O processo de metilação, segundo Haworth, foi repetido por mais três vezes nessas amostras.

Em seguida, os polissacarídeos parcialmente metilados foram dissolvidos em tetraidrofurano (50 ml) e tratados com sulfato de metila (12 ml) e hidróxido de sódio pulverizado (seco em aparelho de Abderhalden, contendo pentóxido de fósforo a 69°). Essas proporções de reagentes são referidas a um grama de polissacarídeo, segundo o processo de metilação descrito por Adams e Bishop (1).

As misturas de reação foram mantidas à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ$), durante 17 horas, com agitação constante (agitador magnético). Após eliminação do solvente sob pressão reduzida a 40° (evaporador rotatório), o resíduo foi solubilizado em água destilada (~ 20 ml) e tratado, inicialmente, com ácido sulfúrico 6 *N* e, posteriormente, com ácido acético 2 *N* até pH 7,0, conservando-se a temperatura das soluções de 0-2°. As soluções contendo os polissacarídeos parcialmente metilados foram dialisadas e as frações não dialisá

veis foram liofilizadas. Esse processo de metilação foi repetido por mais duas vezes, apresentando rendimento nas frações em estudo, variando de 86 a 88%, quando testados pelo método de fenol-ácido sulfúrico (33).

Amostras dos polissacarídeos parcialmente metilados foram permetilados com iodeto de metila (3 ml) e com o íon metil-sulfanilcarbânio 0,023 M (10 ml) (metil sulfinil metanide) em dimetil sulfóxido (50 ml), de acordo com o processo de Hakomori (51), modificado por Sandford e Conrad (89). Essas proporções de reagentes são relativas a um grama de polissacarídeo. A mistura de reação permaneceu sob agitação constante, durante 30 minutos, à temperatura de 15 - 18°. Após neutralização com ácido sulfúrico 6 N, a mistura foi dialisada e a fração não dialisável foi liofilizada. O rendimento final, após esses processos de metilação, variou de 70 a 75% nas frações de polissacarídeos em estudo. A modificação do processo de Hakomori (51) introduzida por Lindberg e Lundstron (74) também foi utilizada no presente trabalho.

Todas as frações de polissacarídeos permetiladas foram purificadas por tratamento com clorofórmio, até completa solubilização e após centrifugação. O resíduo marrom-escuro foi desprezado e o sobrenadante foi acrescentado éter de petróleo, até precipitação total dos polissacarídeos permetilados. No sedimento obtido por centrifugação, esse processo de purificação foi repetido por mais duas vezes e o precipitado de cada fração de polissacarídeo permetilado foi se

cado sob pressão reduzida a 69° em aparelho de Abderhalden (contendo pentóxido de fósforo).

A eficiência desses processos de metilação foi considerada satisfatória, como sugerida pelos dados de análise por espectroscopia de infravermelho (i.v.), embora a pequena absorção observada na região de grupos hidroxílicos seja consistente com a presença de ácido pirúvico nestes polímeros). A análise por t.l.c. (solvente i) dos produtos de metanólise das frações permetiladas não evidenciou a presença de derivados monometil. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (coluna c) dos derivados metilados, na forma de acetatos de alditóis, também não evidenciou a presença de derivados monometil nas frações de polissacarídeos - em estudo.

METILAÇÃO DOS POLÍMEROS DE *M. cornuarietis*.

As amostras de polissacarídeos de *M. cornuarietis* (100 mg de F.Ac e de F.BC) foram metiladas pelos processos de metilação anteriormente descritos e o rendimento em polissacarídeo metilado foi de 73 e 76% para as frações F.AC e F.BC, respectivamente, quando testados pelo método de fenol-ácido sulfúrico.

METANÓLISE DOS POLISSACARÍDEOS PER-*O*-METILADOS DE *P. lineata* e *M. cornuarietis*.

Os polímeros per-*O*-metilados, com e sem acetaldeído pirúvico, de F.A, F.B, F.AC, F.BC, F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3 (10 mg de cada amostra) foram tratados com 3 ml de uma mistura de HCl-metanol anidro 3:100 (v/v), durante 4 horas à temperatura de 100°, em ampola de vidro, segundo o processo descrito por Bouveng e Lindberg (18). Após neutralização do ácido com carbonato de prata e centrifugação, os sobrenadantes foram concentrados sob pressão reduzida (evaporador rotatório) à temperatura de 25-30°. A mistura de metil-*O*-metil-glicosídeos foi analisada por t.l.c. (solvente i) e por g.l.c. (coluna r).

O metanol anidro utilizado nesse processo foi obtido por tratamento de 1 litro de metanol (Merck) com magnésio pulverizado (5 g) e iodo sublimado (0,5 g) em refluxo (30 minutos), seguido de destilação, como descrito por Vogel (104).

A mistura de HCl-metanol foi obtida pela adição gradual de cloreto de acetila ao metanol anidro (previamente esfriado de 0-2°) até a normalidade requerida ser obtida (titulação com hidróxido de sódio 1 *N*).

OBTENÇÃO DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DE
P. lineata e *M. cornuarietis*.

Os polissacarídeos permetilados (10 mg de cada fração) foram, inicialmente, tratados com ácido fórmico a 90% (1 ml), durante uma hora à temperatura de 100°, em ampola de vidro fechada, sob atmosfera de nitrogênio. Após o ácido fórmico ser evaporado sob pressão reduzida a 40°, a hidrólise foi continuada com ácido sulfúrico 0,25 M, a 100°, durante 14 horas. O ácido foi eliminado na forma de sulfato de bário, e o sobrenadante obtido após centrifugação foi tratado com boridreto de sódio (~ 20 mg), durante 6 horas. O excesso do agente redutor foi eliminado com ácido acético 2 N. O íon sódio foi eliminado da preparação por tratamento com resina trocadora de cátions (Dowex 50W x 8, 200 - 400 mesh, forma H⁺) e o ácido bórico resultante foi eliminado por destilação com metanol. Os alditóis obtidos foram acetilados por uma mistura de piridina-anidrido acético (1 ml) e analisados por g.l.c. (colunas s e t) a 170°, sendo os tempos de retenção relativos ao 1,5-di-0-acetil, 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol.

DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DA GALACTOSE DO POLISSA
CARÍDEO DE *M. cornuarietis*, PELO PROCESSO DE LEONTEIN ET AL.

Uma amostra da fucogalactana da glândula de al-
búmen de *M. cornuarietis* foi hidrolisada com ácido trifluoacé

tico 2 *N*, durante 6 horas a 100°. Após eliminação do ácido, sob pressão reduzida, os produtos da hidrólise ácida foram submetidos à cromatografia em camada delgada em sílica gel, solvente (a), com a finalidade de se obter galactose livre de fucose. A galactose, livre de fucose, foi submetida ao processo de Leontein et al. (71) afim de se determinar sua configuração absoluta.

ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE CARBONO-13 E PRÓTON DOS POLISSACARÍDEOS.

Os espectros de ressonância nuclear magnética de carbono-13 (^{13}C -n.m.r.) foram obtidos, usando-se um espectrometro de ressonância nuclear magnética XL-100-FT da Varian. Para determinações de T_1 (tempo de relaxamento longitudinal), e n.O.e. (efeito nuclear de Overhauser), foram usadas soluções a 20% livre de ar. Os deslocamentos químicos do carbono-13 foram expressos como δ_c em relação ao TMS externo (tetrametil silano) cuja ressonância foi determinada num experimento separado (D_2O "lock"). Os deslocamentos químicos do próton são para soluções em D_2O , sendo relativo ao TMS externo, contido em um capilar. Os valores são $\sim 0,41/33^\circ$ e $\sim 0,50$ p.p.m. (70°) maiores do que aqueles descritos quando 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio é usado como padrão interno.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS, USADOS COMO REFERÊNCIA NA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA (estruturas mostradas no esquema VIII).

Metil 3,4-*O*-[1-(hidroximetil)etilideno]- β -*D*-fucopiranosídeo

Uma amostra de metil β -*D*-fucopiranosídeo 7 (7,5 g) foi acrescentada ao acetato de 2-oxopropil (75 ml), contendo ácido sulfúrico (0,3 ml) e peneira molecular de 3A⁰ (Baker, 20 g). O açúcar foi completamente dissolvido, após 2 h. À mistura foi então adicionado o bicarbonato de sódio aquoso contendo gelo e acetato de etila. O extrato foi evaporado a um xarope e dissolvido em metanol contendo 0,1 M de metóxido de sódio (30 ml) que, após 30 minutos, foi evaporado e o resíduo resultante foi desionizado com resinas trocadoras de íons (Amberlite IR-120, forma H⁺ e Dower 1-X8, forma HCO₃⁻). O produto, cristalizado em acetato de etila é o isômero mais abundante do metil 3,4-*O*-[1-(hidroximetil)-etilideno]- β -*D*-fucopiranosídeo - (1,87 g), com ponto de fusão 175-178°, $[\alpha]_D^{25} + 13^\circ$ (c, 0,6, em metanol); os espectros ¹³C-n.m.r. (D₂O, 70°): δ_c 111,81; 104,47; 80,66; 78,08; 74,16; 70,42; 67,59; 58,46; 22,56 e 17,19. Análise calculada para o C₁₀H₁₈O₆ foi (C-51,27, H-7,75) e a encontrada, (C-51,11 e H-7,76).

O sobrenadante da cristalização precedente foi examinado por t.l.c. em placa de sílica gel (solvente n) que mostrou a presença do produto cristalizado previamente com R_f de 0,3 e um

composto com R_f de 0,25. Por cromatografia em coluna de sílica gel (solvente o) do referido sobrenadante obteve-se duas frações: uma contendo o isômero precedente (0,16 g, cristalizada em acetato de etila) e outra contendo o metil 3,4- O -[1-(hidroximetil)etilideno]- β - D -fucopiranosídeo (0,25 g, cristalizada em acetato de etila), com ponto de fusão 131-133°, $[\alpha]_D^{25} + 17^\circ$ (c, 0,7 em água); os espectros ^{13}C -n.m.r. (D_2O , 70°): δ_c 111,64; 104,48; 80,97; 79,15; 74,50; 70,43; 66,85; 58,50; 24,15 e 17,10. Comparando-se os sinais do CH_3 de δ_c 22,56 e 24,15 na mistura original dos isômeros formados na reação com 2-oxopropil acetato, demonstrou-se que eles estão presentes numa relação de $\sim 5:1$.

Análise calculada para o $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_6$ foi (C-51,27 e H-7,75); encontrada (C-51,27 e H-7,70).

Metil 3,4- O -[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β - D -fucopiranosídeo

A maior parte da solução do metil 3,4- O -[1-(hidroximetil)etilideno]- β - D -fucopiranosídeo (1,50 g) em água (10 ml) foi adicionada a uma preparação de platina, recém-preparada por hidrogenação de Adams com óxido de platina cristalizada (1,50 g). A mistura foi mantida a 70° e borbulhando oxigênio com força suficiente para deixar a cristalização suspensa. Uma solução de bicarbonato de sódio (0,59 g) em água (18 ml) foi adicionada à mistura na proporção de 3 ml cada hora. Após 8 h, a solução foi tratada com Amberlite IR-120, forma H^+ , filtrada e liofilizada. O derivado resultante O -(1-carbo-

xietilideno) foi esterificado com diazometano etéreo. Examinado por t.l.c. em sílica gel (solvente p) mostrou traços de material no começo com R_f de 0,3 e o composto principal com R_f de 0,8. Cromatografia em coluna de ácido silícico (clorofórmio) forneceu o material necessário (0,95 g) como um xarope, $[\alpha]_D^{25} + 3^\circ$ (c, 1,0 em metanol); os espectros de ^{13}C -n.m.r. (CDCl_3): δ_c 107,05; 105,87; 103,14; 80,43; 77,18; 77,10; 68,52; 56,76; 52,73; 23,46 e 16,47.

Análise calculada para o $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_7$ (C-50,37 H-6,92) e a encontrada, (C-50,21 H-6,89).

Metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-fucopiranosídeo: ácido livre 8 e o sal de bário, o principal derivado do *O*-(1-hidroximetil)etilideno.

Metil 3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β -*D*-fucopiranosídeo, principal derivado acetato do 3,4-[1-(hidroximetil)etilideno] foi dissolvido em água contendo um excesso de hidróxido de bário, e após 18 h à temperatura ambiente, gelo seco foi adicionado, a mistura foi filtrada e o filtrado evaporado. O resíduo foi extraído com água, a mistura foi filtrada e o filtrado evaporado. O sal de bário resultante tinha $[\alpha]_D^{25} -9^\circ$ (c, 0,3 em água); os espectros de ^{13}C -n.m.r. (D_2O): δ_c 178,49; 108,66; 103,48; 80,51; 78,09; 72,00; 69,92; 58,12; 24,54 e 16,89, em D_2O a 70° : δ_c 178,60; 109,21; 104,11; 81,03; 78,52; 72,53; 70,39; 58,47; 24,89 e 17,31.

O sal de bário foi convertido no ácido livre 8, tendo $[\alpha]_D^{25} -8^\circ$ (c, 0,3 em água) por tratamento com água em Amberlite IR-120, forma H^+ , seguido de filtração e liofilização. Os espectros de ^{13}C -n.m.r. (D_2O) δ_C 174,76; 106,81; 103,61; 81,13; 78,67; 71,78; 69,56; 58,07; 23,99 e 16,70.

Análise calculada para o $C_{10}H_{16}O_7$ foi (C-48,38 e H-6,50) e a encontrada, (C-48,27 e H-6,31).

Metil 6-*O*-benzil- β -*D*-galactopiranosídeo 2

Uma amostra de metil 3,4-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo 1 (8,9 g) foi em parte *O*-benzilado em N,N' -dimetilformamida (30 ml), contendo óxido de prata (18,0 g) e foi misturado 1,3 equivalentes molares de brometo de benzil (5,8 ml). Após 18 h, a mistura foi diluída com diclorometano, em seguida filtrada, e o filtrado evaporado a um xarope, que foi tratado com solução de ácido acético a 80% (100 ml) por uma hora a 100° para remover o grupo *O*-isopropilideno. O produto foi analisado por t.l.c. sílica gel, (solvente n) mostrando 3 manchas com R_f de 0,0; 0,25 e 0,6. Ele foi dividido entre benzeno e água; quando na fase aquosa encontravam-se os materiais correspondentes àqueles com manchas de R_f 0,0 e 0,25. Em seguida, este material foi evaporado, e dissolvido em acetato de etila (100 ml) e éter (100 ml) foi então adicionado, e a solução foi deixada por 24 h a 4° . O líquido mãe foi decantado do precipitado, e evaporado a um xarope que foi cris-

talizado em acetato de etila-hexano 1:1 (150 ml), dando o composto 2 (3,5 g) com ponto de fusão de 104°, $[\alpha]_D^{25} -15^\circ$ (c, 1,2 em etanol); os espectros de ^{13}C -n.m.r. (CDCl_3): δ_c 138,10; 128,50; 128,06; 127,78; 104,18; 73,72 (2 carbonos); 73,68 (2 carbonos); 71,51; 69,43; 69,29 e 57,15.

Análise calculada para o $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_6$ foi (C-59,14 e H-7,09) e a encontrada, (C-58,93 e H-7,11). O material que tinha R_f 0,6 era o metil 2,6-di-*O*-benzil- β -*D*-galactopiranosídeo, e o do acetato de etila-hexano tinha ponto de fusão de 81-82°, $[\alpha]_D^{25} -13^\circ$ (c, 0,6 em etanol), produziu 1,6 g.

Análise calculada para o $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_6$ foi (C-67,36 e H-7,00) e a encontrada, (C-67,47 e H-6,81).

Metil 6-*O*-benzil-3,4-*O*-[1-(hidroximetil)etilideno]- β -*D*-galactopiranosídeo 3

Uma amostra do composto 2 (4,2 g) foi convertido nos seus acetais 3,4-[1-(hidroximetil)etilideno] pelo método já descrito na série furanosídica. O produto contendo 2 isômeros que por t.l.c. em sílica gel (solvente n) tinha R_f de 0,55 maior quantidade composto 3 e de 0,50 em menor quantidade composto 4. De acordo com as intensidades dos sinais dos espectros de ressonância nuclear magnética de carbono-13 do CH_3 em (D_2O) de δ_c 21,94 e 23,60 estavam presentes numa relação 3,3:1. A cristalização em éter deu o isômero principal 3

(1,20 g) com ponto de fusão 116°, $[\alpha]_D^{25} -13^\circ$ (c, 0,6 em etanol). Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (D_2O): δ_{C} 138,32; 129,92; 129,71; 129,58; 111,88; 103,86; 80,07; 75,07; 74,72; 74,28; 73,72; 72,63; 70,01; 66,70; 58,19 e 21,94. O material do líquido mãe foi recuperado (1,13 g).

Análise calculada para o $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_7$ foi (C-59,99 e H-7,11) e a encontrada, (C-59,73 e H-6,97).

Metil 3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β -*D*-galactopiranosídeo.

O produto em maior quantidade do processo experimental composto 3 (0,90 g) foi oxidado sucessivamente com Pt/O_2 e esterificado com diazometano como descrito anteriormente. O processo de cromatografia em ácido silícico proporcionou uma fração (0,37 g) correspondente ao 6-*O*-benzil-3,4-*O*-[1-metoxicarbonil)etilideno]- β -*D*-galactopiranosídeo, que foi hidrogenolizado com paládio em carvão a 5% com ácido acético. A mistura foi filtrada e o filtrado liofilizado, dando o metil 3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β -*D*-galactopiranosídeo. Em seguida foi cristalizado em acetato de etila-éter 1:1 com ponto de fusão 152-153°, $[\alpha]_D^{25} -8^\circ$ (c, 1,0 em metanol), produziu (0,25 g). Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (CDCl_3): δ_{C} 169,96; 106,47; 103,31; 80,56; 74,82; 73,18; 71,41; 62,26; 57,20; 52,95 e 23,60.

Análise calculada para o $C_{11}H_{18}O_8$ foi (C-47,48 e H-6,52) e a encontrada, (C-47,65 e H-6,59).

O líquido mãe da preparação do composto 3 continha o isômero 4, e a mistura do xarope (1,13 g) foi oxidada com Pt/O₂ e então convertida no metil éster. O material foi dividido entre clorofórmio e água e o presente material na camada clorofórmica foi hidrogenalizado com paládio em carvão a 5% em ácido acético. Por t.l.c. sílica gel (solvente n) mostrou a presença de 3 componentes tendo R_f 0,50, 0,55 e 0,60 cromatografia em coluna de ácido sílicico 50:1 (v/v) clorofórmico metanol forneceu um componente tendo R_f 0,60 que foi o outro isômero do metil 3,4-O-[1-(metoxicarbonil)etilideno]-β-D-galactopiranosídeo que cristalizado em éter-hexano tinha ponto de fusão 147-149°, [α]_D²⁵ -13° (c, 0,5 em metanol); produziu 0,07 g. Os espectros ¹³C-n.m.r. em (CDCl₃): δ_c 170,05; 106,96; 103,23; 79,26; 75,82; 74,06; 73,24; 62,12; 57,21; 52,64 e 23,49.

Análise calculada para o $C_{11}H_{18}O_8$ foi (C-47,48 e H-6,52) a encontrada, (C-47,74 e H-6,47).

Metil 3,4-O-(1-carboxietilideno)-β-D-galactopiranosídeo 6, ácido livre e o sal de bário derivados do maior isômero composto 3

O sal de bário do composto 6 com [α]_D²⁵ -6° (c, 0,3 em água),

foi preparado por ação de solução de hidróxido de bário do derivado 3 o 3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno]. Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (D_2O): δ_{C} 178,40; 109,07; 103,71; 80,63; 75,45; 74,16; 72,15; 62,12; 58,22 e 24,55; (D_2O , 70°): δ_{C} 178,49; 109,60; 104,31; 81,12; 76,00; 74,62; 72,63; 63,64; 58,56 e 24,98. O ácido do composto 6 tinha $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -5^\circ$ (c, 0,3 em água). Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (D_2O): δ_{C} 174,41; 107,24; 103,68; 80,42; 74,26; 74,04; 71,92; 61,94; 58,13 e 24,50.

Análise calculada para o $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_8$ foi (C-45,45 e H-6,10) e a encontrada, (C-45,13 e H-6,34).

Metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo 5, ácido livre e sal de bário derivados do menor isômero do composto 4.

O sal de bário do composto 5 tinha $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -6^\circ$ (c, 0,3 em água). Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (D_2O): δ_{C} 178,84; 108,92; 103,85; 79,88; 76,00; 74,54; 74,17; 61,94; 58,15 e 24,58; (D_2O , 70°): δ_{C} 109,45; 104,47; 80,44; 76,46; 74,93; 74,71; 62,50; 58,54 e 25,05. O ácido livre tinha $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -10^\circ$ (c, 0,2 em água). Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (D_2O): δ_{C} 175,37; 107,44; 103,79; 80,40; 76,64; 74,30; 74,01; 68,20; 61,88 e 24,06.

Análise calculada para o $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_8$ foi (C-45,45 e H-6,10) e a encontrada, (C-45,09 e H-6,34).

Metil 6-*O*- β -*D*-galactopiranosil-3,4-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo.

Uma amostra de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -*D*-galactopiranosil - brometo (0,5 g) foi adicionado em 5 porções a uma mistura de metil 3,4-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo (0,50 g), agitando em diclorometano (10 ml), contendo carbonato de prata (2,5 g) e peneira molecular de 3A⁰ da Baker (5 g). Após 2 horas, a mistura foi diluída com diclorometano que foi filtrada e o filtrado foi evaporado a um xarope. O produto foi desacetilado com metóxido de sódio em metanol e, após 30 minutos, a solução foi neutralizada com dióxido de carbono, evaporada e o resíduo resultante foi desionizado em água com resinas trocadoras de íons. O material continha galactose e a substância pretendida, com mobilidade igual àquela da ramnose numa cromatografia em papel (solvente g) forneceu metil 6-*O*- β -*D*-galactopiranosil-3,4-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo (0,4 g), $[\alpha]_D^{25} + 20^\circ$ (c, 0,5 em água). Os espectros de ¹³C-n.m.r. em (D₂O): δ_C 112,10; 104,55; 103,96; 79,94; 76,31; 75,08; 73,88; 73,83; 73,20; 71,90; 69,93; 69,80; 62,04; 58,39; 28,36 e 26,63.

Análise calculada para o C₁₆H₂₈O₁₁ foi (C-48,48 e H-7,12) e a encontrada, (C-48,23 e H-7,01).

Metil 2-*O*- β -*D*-galactopiranosil-3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno- β -*D*-fucopiranosídeo 11

Uma amostra de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -*D*-galactopiranosilbrometo (1,5 g) foi condensado com o metil 3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β -*D*-fucopiranosídeo (0,35 g) pelo processo já descrito. Após tratamento com diazometano, o produto foi analisado por t.l.c. em sílica gel (solvente g) e as manchas tinham R_f de 0,8 (éster original) e o composto com R_f de 0,15 foi detectado. Cromatografia em coluna de celulose (solventes, benzeno-metanol 10:1,4 e 3:1 (v/v)), sucessivamente produziu metil 2-*O*- β -*D*-galactopiranosil-3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β -*D*-fucopiranosídeo (136 mg), $[\alpha]_D^{25} + 4^\circ$ (c, 0,3 em metanol).

Análise calculada para o $C_{17}H_{28}O_{12}$ foi (C-48,11 e H-6,65) e a encontrada, (C-48,43 e H-6,83).

O sal de bário do derivado 3,4-*O*-(1-carboxietilideno) 11 foi preparado por hidrólise alcalina. Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (D_2O): δ_c 177,31; 108,41; 102,74; 101,95; 80,46; 78,37; 77,43; 76,10; 73,92; 72,12; 69,91; 62,11; 57,64; 24,65 e 16,79; (D_2O , 0,70°): δ_c 108,98; 103,26; 102,73; 80,83; 78,73; 78,19; 76,52; 74,59; 71,82; 70,50; 62,59; 58,03; 25,06 e 17,23.

O ácido livre derivado do composto 11 tinha $[\alpha]_D^{25} - 7^\circ$ (c, 0,3 em água). Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (D_2O): δ_c 174,80; 107,01; 102,50; 101,90; 81,23; 78,92; 76,70; 76,20; 73,93; 71,98; 69,81; 69,64; 62,02; 57,69; 24,09 e 16,67.

Metil 4,6-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo

Uma amostra de metil 2,3-di-*O*-acetil-4,6-*O*-benzilideno- β -*D*-galactopiranosídeo (4,0 g) foi parcialmente hidrolisado com solução de ácido acético a 80% (80 ml) por 1 hora a 100° e a solução, evaporada. O resíduo foi agitado com acetona (200 ml) contendo ácido sulfúrico (10,2 ml) e sulfato de cobre anidro (50 g) por 2 horas em seguida foi adicionada piridina (10 ml) e, a solução filtrada e evaporada. O produto foi desacetilado com metóxido de sódio em metanol (20 ml), a solução foi evaporada e o resíduo desionizado em solução aquosa com resinas trocadoras de íons. O produto contendo metil β -*D*-galactopiranosídeo como um contaminante do seu acetal 4,6-isopropilideno, foi cromatografado numa coluna de ácido silícico (eluente clorofórmio-metanol 25:1 v/v). O metil 4,6-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo resultante, foi cristalizado em acetato de etila-éter, tinha ponto de fusão 161-163° $[\alpha]_D^{25}$ -17° (c, 0,7 em etanol); produziu 56%. Os espectros de ^{13}C -n.m.r. em (D₂O): δ_c 104,46; 100,73; 72,63; 71,43; 69,58; 67,34; 63,39; 58,17; 29,45 e 19,05.

Análise calculada para o C₁₀H₁₈O₆ foi (C-51,27 e H-7,55) e a encontrada, (C-51,27 e H-7,65).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

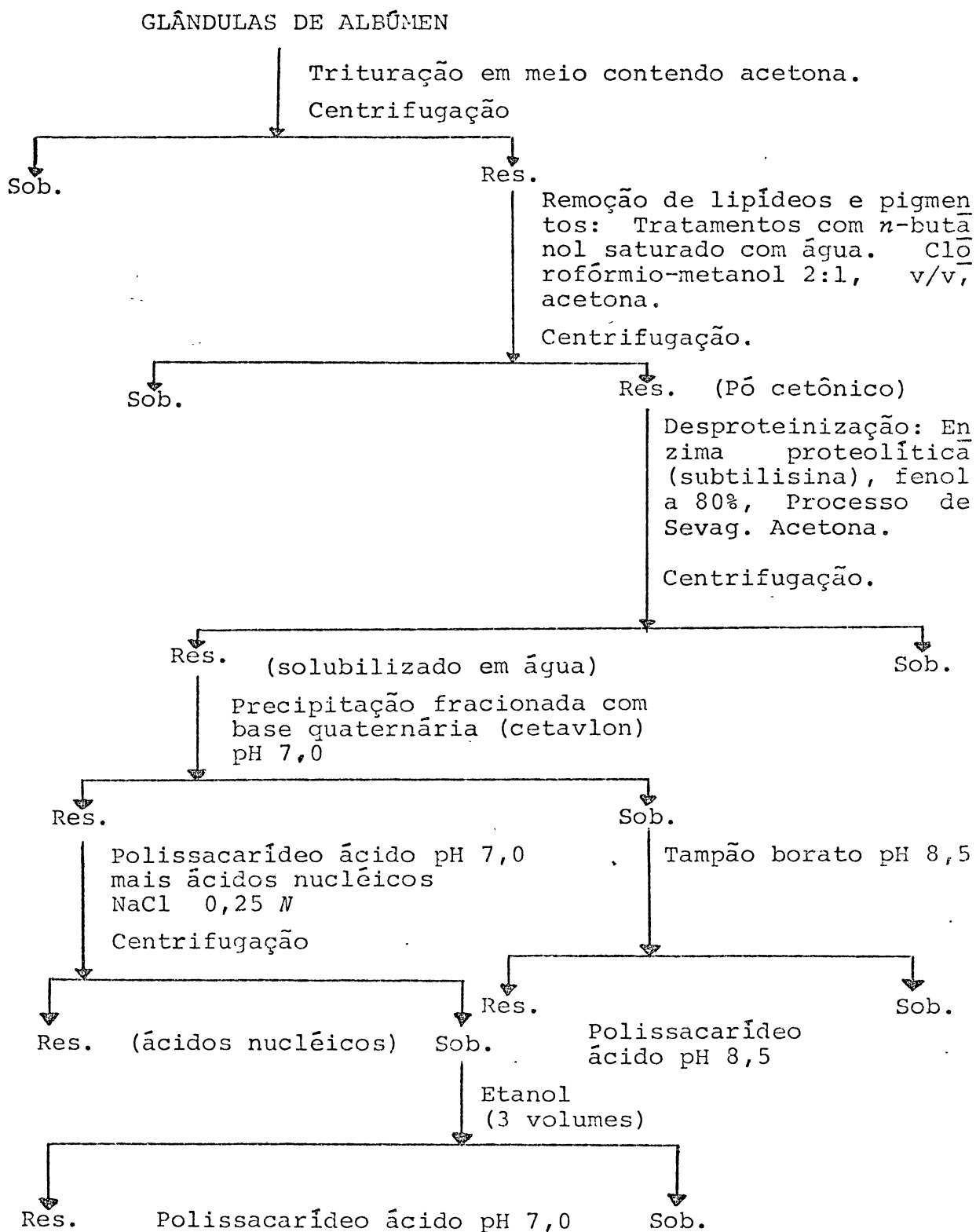
ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata*

As espécies de moluscos, *P. lineata*, foram coletadas em Recife, PE, como já descrito no material e métodos. As glândulas de albúmen destes moluscos foram dissecadas e homogeneizadas com acetona em liquidificador. Após filtração, o resíduo foi tratado sucessivamente com acetona, uma mistura clorofórmio-metanol e *n*-butanol-saturado com água, visando a eliminar pigmentos e lipídeos. A fração lipídica, contendo pigmentos, não foi estudada na presente investigação.

Com finalidade de eliminar proteína, a preparação foi tratada com enzimas proteolíticas (Subtilisina, tipo II, Sigma) e pelo processo de Sevag, modificado por Staub (98).

A preparação contendo polissacarídeo foi fracionada com base quaternária (brometo de hexadeciltrimetilamônia, cetavlon) em diferentes pH, de acordo com o processo utilizado por Duarte e Jones (32) para purificação de polissacarídeo de *S. oblongus*. Desse modo, foram obtidos dois polissacarídeos ácidos, um em pH 7,0 (F.A) e outro, em pH 8,5 (F.B), após tratamento com tampão borato. (Esquema I) os quais ainda apresentavam traços de proteína (0,2 a 0,3 g %, Tabela I).

ESQUEMA I - PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *P. lineata*



Os polissacarídeos de *M. cornuarietis* também foram obtidos, segundo a metodologia resumida no Esquema I.

Feijó e Duarte (39), submetendo a fração de polissacarídeo de uma espécie de *Ampullarius* (Morretes, PR.) obtiveram apenas um polissacarídeo que foi obtido pela complexação com tampão borato, em pH 8,5. O mesmo ocorreu com o isolamento do polissacarídeo ácido de uma outra espécie de *Ampullarius* (Santo Antonio da Platina, PR.) (17). Já o fracionamento da fração de polissacarídeos ácidos de *M. cornuarietis* apresentou comportamento semelhante ao de *P. lineata*.

Não foi esclarecida a separação dos polissacarídeos ácidos de *P. lineata* e de *M. cornuarietis* em duas subfrações, ambas de polímeros ácidos, pela utilização de base quaternária, já que os dados das Tabelas I, II e III demonstram uma composição química semelhante para os polissacarídeos de *P. lineata*. A sugestão de que o acetal de ácido pirúvico destes polissacarídeos se encontrasse parcialmente lactonizado ou esterificado, poderia explicar a precipitação fracionada desses polissacarídeos, em presença de base quaternária em diferentes pH. Entretanto, essas hipóteses não encontram subsídios na análise de grupo metoxil (Tabela I) ou de lactonas por espectroscopia de infravermelho dos polissacarídeos de *P. lineata* e de *M. cornuarietis*.

Análise, por electroforese em fita de acetato de celulose, dos polissacarídeos de *P. lineata*, (F.A e F.B) e os

TABELA I - ANÁLISE QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE
ALBÚMEM DE *P. lineata*

DETERMINAÇÕES	g%			
	F.A	F.B	F.AC	F.BC
Polissacarídeo ^a	64,0	65,0	68,0	68,0
Água ^b	28,6	27,5	26,3	26,9
Cinza ^c	0,2	0,3	0,2	0,2
Acetal de ácido pirúvico ^d	1,4	1,4	1,8	1,7
Grupo acetil ^e	5,5	5,5	3,5	3,0
Proteína ^f	0,3*	0,3*	0,2	0,2
Fosfato ^g	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sulfato ^h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hexosamina ⁱ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido siálico ^j	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido urônico ^k	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Éster metoxílico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* (0,05 g% de N₂)

^aAçúcar total determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (33);

^bAmostra seca à 100° até peso constante

^cAmostra incinerada à 800°, até peso constante;

^dDeterminado no hidrolisado ácido dos polissacarídeos, pelo processo de Duckworth e Yaphe (34) e expresso em ácido pirúvico;

^eDeterminado pelo processo de McComb e McCready (82);

^fProteína determinada pelo processo de Lowry et al. (76);

^gFosfato (27), ^hsulfato (6), ⁱhexosamina, (15), ^jácido siálico (23), (92), (105);

^kÁcido urônico (4) e ^lÉster metoxílico (91) não foram detectados nas amostras analisadas;

n.d. : não detectado;

F.A e F.B = Polissacarídeos de *P. lineata*;

F.AC e F.BC = Polissacarídeos de *M. cornuarietis*

TABELA II - COMPOSIÇÃO EM CARBOÍDRATO DOS POLISSACARÍDEOS
 ÁCIDOS DE *P. lineata* e *M. cornuarietis* por
 g.l.c.^a

ACETATOS DE ALDITÓIS	T ^b	MOLES %	
		F.A e F.B	F.AC e F.BC
Fucitol	0,6	-	7
Galactitol	2,1	100,0	93

a

Coluna r, na forma de acetato de alditol

b

Tempo de retenção relativo ao xilitol petacetato

F.A e F.B = Polissacarídeos obtidos de *P. lineata*, pelo fra-
 cionamento com cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

F.AC e F.BC = Polissacarídeos obtidos de *M. cornuarietis* pe-
 lo fracionamento com cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

TABELA III - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS DE MOLUSCOS CONTENDO ACETAL DE ÁCIDO PIRÚVICO.

POLISSACARÍDEOS	RELAÇÃO MOLAR		
	Anidro hexose ^a	Grupo acetil ^b	Acetal de ácido pirúvico ^c
F.A	23	5	1
F.B	23	5	1
F.AC	20	5	1
F.AB	20	5	1
F.G	59	nd	1

a
Determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (33)

b
Determinada pelo processo de McComb e McCready (82)

c
Determinado pelo processo de Duckworth e Yaphe (34)

F.A e F.B = Polissacarídeos obtidos de *P. lineata* pelo fracionamento com cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

F.AC e F.BC = Polissacarídeos obtidos de *M. cornuarietis* pelo fracionamento com cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

F.G = Polissacarídeo obtidos de uma espécie de *Ampullarius* de Morretes, PR, pelo fracionamento com cetavlon em pH 8,5,

n.d. = não detectado.

de *M. cornuarietis* (F.AC e F.BC), previamente corados com azul de Procion, indica que são constituídos de uma mistura inseparável, nas condições utilizadas. Desse modo, esses polissacarídeos foram considerados adequados para a finalidade a que se propõe a presente investigação. Tentativas de dissociar cada uma dessas frações de polissacarídeos ácidos, utilizando-se DEAE-Sephadex A-25, não tiveram sucesso, devido ao caráter viscoso dos mesmos.

Embora nenhuma tentativa posterior tenha sido realizada, com a finalidade de fracionar os polissacarídeos F.A, F.B, F.AC e F.BC, os resultados das investigações com polissacarídeos de microorganismos, contendo acetal de ácido pirúvico indicam que esses polímeros são heterogêneos com relação ao teor do acetal. Sandford et al. (89) investigaram quatro frações de polissacarídeos ácidos obtidos de *X. campestris* NRRL B-1459, as quais apresentavam teores variáveis de acetal de ácido pirúvico (1,3 - 5,9 g %). Submetendo-se cada uma dessas frações à precipitação fracionada com etanol, obtiveram várias subfrações de polissacarídeos ácidos, as quais apresentavam teores variáveis de acetal de ácido pirúvico. Embora o mecanismo destes fracionamentos não tenha sido esclarecido, os autores sugerem que o mesmo esteja mais associado com as variações de peso molecular dos polissacarídeos do que com as oscilações em seus teores de acetal de ácido pirúvico.

Cadmus et al. (25) demonstraram que a percentagem de acetal de ácido pirúvico nos polissacarídeos de *X. campes-*

tris NRRL B-1549 varia com o meio de cultura e a cepa utilizada, e que a percentagem de acetal nesses polímeros era baixa, nos estágios iniciais, e elevada, nos estágios finais do processo fermentativo. A precipitação fracionada com etanol, determinação de peso molecular, ou a seleção de moluscos em diferentes faixas etárias não foram realizadas na presente investigação.

Entretanto, os dados da Tabela III também demonstraram certa oscilação com respeito ao teor de acetal de ácido pirúvico dos polissacarídeos isolados de moluscos do gênero *Ampullarius*. A galactana isolada de uma espécie de molusco do gênero *Ampullarius* (Morretes, PR.) apresentou um teor em acetal de ácido pirúvico bastante inferior aos dos polissacarídeos de *P. lineata* e *M. cornuarietis* (relação molar hexose: ácido pirúvico de 59 para 1). Borges (17) caracterizou uma galactana de uma espécie de *Ampullarius* de Santo Antonio da Platina, PR, cuja percentagem de acetal de ácido pirúvico era semelhante à encontrada nos polissacarídeos de *M. cornuarietis*.

A presença de acetal de ácido pirúvico não constitui uma característica dos polissacarídeos de moluscos do gênero *Ampullarius*. Feijó investigou uma glucogalactana de massa de ovas (40) de uma espécie de *Ampullarius* de Pelotas, RS., completamente desprovida de acetal de ácido pirúvico.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata* E DE *M. cornuarietis*.

Os polissacarídeos de *P. lineata* (F.A e F.B) são formados de galactose, grupo acetil e acetal de ácido pirúvico, numa relação molar de 23:5:1. A configuração absoluta da galactose foi estabelecida, como sendo a forma *D*, pela oxidação completa desta hexose a *D*-galacto-hexodialdose em presença de *D*-galactose oxidase, de *Polyporus circinatus*, enzima específica para *D*-forma da galactose. (3). O valor de rotação ótica específica do produto de hidrólise ácida $[\alpha]_D^{25} + 80^\circ$ (c, 0,5 em água), produto cristalino em etanol dos polissacarídeos F.A e F.B é também compatível com *D*-galactose. A análise dos produtos de hidrólise ácida dos polissacarídeos F.A e F.B, pela *L*-fucose desidrogenase, de *Pullularia pullulans*, enzima específica para *L*-fucose e *L*-galactose, não mostrou nenhuma atividade enzimática, o que evidencia, também a ausência de *L*-forma de galactose ou de *L*-fucose neste polímero.

Estes dados, juntamente com os valores de rotação ótica específica dos polissacarídeos F.A $[\alpha]_D^{25} + 36,57^\circ$ e de F.B $[\alpha]_D^{25} + 36,97^\circ$ (Tabela IV) e os resultados de análise da oxidação com trióxido de cromo dos polissacarídeos peracetilados, F.A e F.B, indicam que os polissacarídeos de *P. lineata* são formados, em sua maioria, de unidades de β -*D*-galactopirano se. De fato, a recuperação de *D*-galactose, como acetato de alditol, foi drasticamente reduzida em função do tempo de oxi-

dação (trióxido de cromo) e nenhum acetato de galactitol foi detectado em todas as galactanas, após 24 h de oxidação. Uma amostra de glicogênio de fígado de coelho (Sigma), submetido ao mesmo tratamento oxidativo, foi recuperado, completamente, como acetato de *D*-glucitol.

O caráter ácido dos polissacarídeos de *P. lineata* já havia sido assinalado por Duarte, (30) como devido ao acetal de ácido pirúvico. Reinvestigando estes polímeros, nenhum outro ácido foi detectado, exceto o ácido pirúvico na forma de acetal, conforme demonstram os dados da Tabela I. Os valores do equivalente ácido destes polímeros Eq. 3.751 (F.A) e Eq. 3.789 (F.B) são compatíveis com os teores assinalados para o acetal de ácido pirúvico nestes polissacarídeos (Tabela I).

A presença de acetal de ácido pirúvico também foi detectada nos polissacarídeos de *M. cornuarietis* (1,8 g % para F.AC e 1,7 g % para F.BC, (Tabela I).

Petiz (87), estudando a composição dos polissacarídeos de massa de ovas de *P. lineata*, Recife, PE, recém-coletadas (6 a 12 horas após a oviposição) obteve uma relação molar: hexose, grupo acetil, acetal de ácido pirúvico de 20:6:1 que é semelhante àquela obtida nos polissacarídeos isolados de glândula de albúmen do mesmo molusco (Tabela III).

Essa identidade estrutural entre polissacarídeos da glândula de albúmen e da massa de ovas (recém-coletadas) já fora previamente observada por Iacomini et al. (65) que demonstraram serem os polissacarídeos de massas de ovas (recém-coletadas) e de glândulas de albúmen de moluscos do gênero *Biomphalaria*, quimicamente semelhante.

A composição química dos polissacarídeos de *M. cornuarietis* (F.AC e F.BC) diverge daquela dos polímeros de *P. lineata* no que concerne à presença de *L*-fucose. Os produtos de hidrólise ácida dos polissacarídeos F.AC $[\alpha]_D^{25} -17,46^\circ$ e de F.BC $[\alpha]_D^{25} -17,87^\circ$, quando analisados por g.l.c., na forma de acetato de alditol, demonstraram uma relação molar de galactose-fucose de 13:1, (Tabela II).

A configuração absoluta das unidades destes polissacarídeos foi investigada pelos testes da *D*-galactose oxidase e *L*-fucose desidrogenase, como formadas de forma *D* para galactose e forma *L*, para fucose. Em virtude de *L*-fucose desidrogenase ser uma enzima específica para *L*-fucose e *L*-galactose, a configuração absoluta de galactose de F.AC e de F.BC foi também analisada pelo método de Leontein et al (71). Submetendo-se o hidrolizado ácido dos polissacarídeos da *M. cornuarietis* à cromatografia preparativa (placa de alumínio, recoberta com sílica gel, sistema a) foi possível obter-se galactose, livre de fucose. A galactose foi tratada com (-) 2-octanol, contendo traços de ácido trifluoroacético (temperatura

de 130°) e os glicosídeos obtidos foram acetilados. Os produtos desta reação foram examinados por g.l.c., usando-se coluna capilar (25 m) forrada com SP-1000, à temperatura de 230°. A análise cromatográfica demonstrou vários picos, com tempos de retenção relativos ao do derivado 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-glucitol, de 7,29; 7,78; 8,81 e 9,01. Estes valores são relacionados com os derivados de *D*-galactose. Não foram detectados picos (6,56; 8,08 a 10,47) correspondentes aos da forma *L* da galactose.

Deste modo, as fucogalactanas de *M. cornuarietis* contêm apenas a forma *D* da galactose, e a atividade enzimática da *L*-fucose desidrogenase observada no hidrolizado ácido destes polissacarídeos pode ser atribuída somente à *L*-fucose.

O valor de rotação ótica das fucogalactanas de *M. cornuarietis* (F.AC = -17,45°, F.BC = -17,87°, Tabela III) é bastante próximo daquele de rotação ótica da galactana de *H. pomatia* $[\alpha]_D^{25}$ -20°. Esta galactana apresenta formas *D* e *L* de galactose, cuja relação molar é responsável pelo valor negativo de sua rotação ótica. Deste modo, as galactanas de *P. lineata*, sendo constituídas apenas de unidades de β -*D*-galactopirranose, apresentam valor de rotação ótica positiva - (Tabela IV).

Embora os polissacarídeos de *P. lineata* e *M. cornuarietis* contenham grupo acetil (Tabela I), outros polissacarídeos de moluscos contendo acetal de ácido pirúvico são des-

TABELA IV - VALORES DE ROTAÇÃO ÓTICA ESPECÍFICA DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata* e *M. cornuarietis*.

DETERMINAÇÕES	POLISSACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN						
	F.A	F.B	F.AD-1	F.AD-2	F.AD-3	F.AC	F.BC
$[\alpha]_{D}^{25}$ ^a	+36,57°	+36,97°	+14,29°	+10,00°	+8,16°	-17,46°	-17,87°
Hexose (g %) ^b	63,4	65,0	67,1	67,5	70,2	66,8	65,4

a
Rotação ótica específica determinada em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 141, usando-se os polissacarídeos na concentração de ~0,5 g % de hidróxido de sódio 0,1 N

b
Determinada pelo processo do fenol-ácido sulfúrico (33)

F.A e F.B = Polissacarídeos obtidos de *P. lineata*, pelo fracionamento com cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

F.AC e F.BC = Polissacarídeos obtidos de *M. cornuarietis*, pelo fracionamento com cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3 = Polissacarídeos acetalizados recuperados, respectivamente, na primeira, segunda e terceira fases de degradação seqüenciada tipo Smith do polissacarídeo F.A.

providos de grupo acetil, como ocorre com galactana isolada de uma espécie de *Ampullarius* de Santo Antonio da Platina, PR. (17), e com a fucogalactana de molusco investigada por Feijó e Duarte (39). Recentemente Feijó também (49) isolou uma glucogalactana, desprovida de grupo acetil. Não se exclui nestas investigações a possibilidade de ocorrência de desacetilação, devido a tratamentos alcalinos, durante o processo de permetilação dos polímeros.

O ácido pirúvico liberado das frações de F.A e F.B de *P. lineata* e da F.AC e F.BC de *M. cornuarietis*, por tratamento com ácido oxálico, foi analisado pelo sistema de desidrogenase láctica-NADH e, na forma de derivado de 2,4-dinitrofenilidrazona p.f. 217° - 219°; Sloneker e Orentas obtiveram 219° (95) para o derivado 2,4-dinitrofenilidrazona do ácido pirúvico. O derivado 2,4-dinitrofenilidrazona do ácido pirúvico (de *P. lineata* e de *M. cornuarietis*) foi analisado também por cromatografia em papel (solvente, e) com R_f de 0,53, idêntico ao da hidrozona de ácido pirúvico, usada como referência. A hidrazona do ácido alfa-cetoglutárico, usada também como referência, apresentou um R_f de 0,35. Tulpule e Patwordhan (102) obtiveram R_f de 0,55 e 0,37, nas mesmas condições para os derivados 2,4-dinitrofenilidrazona de ácido pirúvico e de alfa-cetoglutárico, respectivamente.

ANÁLISE DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS METILADOS DE *P. lineata* e *M. cornuarietis*.

Os polissacarídeos de *P. lineata* (F.A e F.B) foram metilados, com a finalidade principal de se localizarem os acetais de ácido pirúvico nestes polissacarídeos. Entre os produtos de metanólise do polissacarídeo metilado (F.A) aparece o derivado metil 2,6-di-*O*-metil-*D*-galactopiranosídeo (Tabela V). Este derivado não aparece entre os produtos de metanólise do polissacarídeo F.A, do qual foi removido o acetal de ácido pirúvico, antes de submetê-lo ao processo de metilação (Tabela VI). Estes dados indicam, portanto, que a ligação acetálica de ácido pirúvico envolve *O*-3 e *O*-4 de algumas unidades dos polissacarídeos de *P. lineata*. A ausência de derivado mono-*O*-metil-*D*-galactose (na forma de acetato de alditol (Tabela VIII) exclui o envolvimento das unidades internas do polímero F.A na ligação acetálica de ácido pirúvico.

Na análise (Tabela V), observou-se também uma percentagem de metil 2,3,6-tri-*O*-metil-*D*-galactopiranosídeo (1 mol %), cujo significado estrutural é desconhecido. Não foi excluída a possibilidade de metilação incompleta. Duarte e Jones (32) encontraram 0,5 moles % deste derivado, quando investigaram a galactana de *Strophocheilus oblongus*, e sua presença foi atribuída à metilação incompleta.

TABELA V - ANÁLISE DOS PRODUTOS DE METANÓLISE DOS POLISSACARÍDEOS METILADOS DE *P. lineata*

O-METIL-D-GALACTOSÍDEOS	T ^a	MOLES % ^b				
		F.A	F.B	F.AD-1	F.AD-2	F.AD-3
2,3,4,6-tetra-O-metil-D-Galp	2,0	38	38	25	18	10
2,3,6-tri-O-metil-D-Galp	3,8	1	1	-	-	-
2,4,6-tri-O-metil-D-Galp	5,0m 6,0m	11	12	30	43	52
2,3,4-tri-O-metil-D-Galp	10,0	6	5	12	9	12
2,6-di-O-metil-D-Galp	13,0	3	3	4	6	8
2,4-di-O-metil-D-Galp	25,0m 30,0g	41	41	29	24	18

^a

Tempos de retenção relativos ao do metil 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-glucopiranosídeo

^b

Determinado por g.l.c. (coluna r); m = médio e g = grande

F.A e F.B = Polissacarídeos ácidos de glândula de albúmen de *P. lineata*, obtidos do fracionamento com os cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3 = Polissacarídeos ácidos recuperados da primeira, segunda e terceira degradações sequenciadas tipo Smith, do Polissacarídeo F.A.

TABELA VI - ANÁLISE DOS PRODUTOS DE METANÓLISE DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata* METILADOS, APÓS REMOÇÃO DO ÁCIDO PIRÚVICO.

O-METIL-D-GALACTOSÍDEOS	T ^a	MOLES % ^b			
		F.A* [*]	F.A* [*] D-1	F.A* [*] D-2	F.A* [*] D-3
2,3,4,6-tetra-O-metil-D-Galp	2,0	41	24	21	18
2,4,6-tri-O-metil-D-Galp	5,0m6,0g	11	42	44	50
2,3,4-tri-O-metil-D-Galp	10,0	7	10	14	14
2,4-di-O-metil-D-Galp	25,0m30,0g	41	24	21	18

a

Tempo de retenção relativo ao do metil 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-glucopiranosídeo.

b

Determinado por g.l.c. (coluna r); m = médio e g = grande.

F.A* - Polissacarídeo (pH 7) de glândula de albúmen de *P. lineata*, que foi removido o acetal de ácido pirúvico, seguido de metilação e metanólise.

F.A*D-1, F.A*D-2 e F.A*D-3 - Polissacarídeos recuperados da primeira, segunda e terceira degradações seqüenciadas tipo Smith, do polissacarídeo F.A (ver Tabela IV), dos quais foram removidos o acetal de ácido pirúvico, seguidos de metilação e metanólise.

Uma percentagem de metil 2,3,6-tri-*O*-metil-*D*-galactosídeo também foi observada nos produtos de metanólise da F.AC de *M. cornuarietis* (Tabela VII). Estes dados estão de acordo com dificuldade de eterificação e esterificação completas de *O*-4 axial na *D*-galactose.

O estabelecimento das condições ótimas de hidrólise do grupo acetal, sem envolver degradações apreciáveis do polímero, é uma tarefa difícil. Na presente investigação, o polissacarídeo F.A (1,2 g) foi tratado com ácido oxálico 0,04 *N* (200 ml) durante 3 horas à temperatura de 100°. Correlacionando-se os dados das Tabelas V e VI, observa-se que não houve degradação apreciável do polímero F.A.

Embora, no meio da reação da hidrólise ácida, não tenham sido detectados oligossacarídeos (cromatografia em papel), a ocorrência de fragmentação parcial do polímero não fica excluída. Por isso, esse processo de hidrólise deve ser reestudado com mais detalhes, assinalando-se certos parâmetros da reação como pH, e tempo de reação em temperatura controlada, a fim de facilitar a reprodutibilidade do processo por outros investigadores.

As condições de hidrólise ácida, adotada na presente investigação para remover o grupo acetal de polissacarídeo, são mais drásticas do que

TABELA VII - ANÁLISE DOS PRODUTOS DE METANÓLISE DO POLISSACARÍDEO METILADO DE *M. cornuarietis*.

O-METIL-D-HEXOSÍDEO	T ^a	MOLES % ^b	
		F.AC	F.BC
2,3,4-tri-O-metil-L-Fucp	0,6	6	5
2,3,4,6-tetra-O-metil-D-Galp	2,0	30	31
2,3,6-tri-O-metil-D-Galp	3,9	1	1
2,4,6-tri-O-metil-D-Galp	5,0m 6,0g	12	11
2,3,4-tri-O-metil-D-Galp	9,9	5	6
2,6-di-O-metil-D-Galp	12,8	5	5
2,4-di-O-metil-D-Galp	25,8m 30,8g	41	41

a

Tempos de retenção relativos ao do metil 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-glucopiranosídeo.

b

Determinação por g.l.c. (coluna r); m = médio e g = grande.

F.AC e F.BC = Fucogalactanas ácidas de glândula de albúmen de *M. cornuarietis*, obtidos pelo fracionamento com cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

aquelas utilizadas para remover o grupo acetal de ácido pirúvico ligados aos grupos hidroxílicos vicinais, transdiequatoriais de unidades de hexoses em conformação 1C_4 . Devido a esta configuração, Lew e Heidelberger (73) removeram o acetal de ácido pirúvico do polissacarídeo capsular de *Pneumococcus* tipo IV, em condições muito suaves, utilizando (ácido sulfúrico 0,005 M, durante 30 minutos à temperatura de 70° Belbault et al. (12) removeram 70% do acetal de ácido pirúvico do polissacarídeo de *Klebsiella*, serotipo K 32, pelo tratamento do polímero apenas com resina trocadora de cátion (Amberlite IR-120, forma H⁺) à temperatura ambiente.

Os dados de metilação dos polissacarídeos metilados de *P. lineata* (Tabela V, F.A e F.B) também indicaram, para esses polímeros, alto grau de ramificação, com 41 moles % de grupos terminais não redutores, sendo constituídos de unidades de *D*-galactopiranosose (38 moles % de metil 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-galactopiranosídeo) e de unidades de 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo (3 moles % de metil 2,6-di-*O*-metil-*D*-galactopiranosídeo). Também foi observada substituição em *O*-3 (11 moles % de metil 2,4,6-tri-*O*-metil-*D*-galactopiranosídeo) e *O*-6 (6 moles % de metil 2,3,4-tri-*O*-metil-*D*-galactopiranosídeo) das unidades internas desses polímeros. Os resultados da análise de metilação, portanto, indicam para o núcleo dos polímeros de *P. lineata* (após remoção do acetal de ácido pirúvico), uma estrutura altamente ramificada que não diverge da de galactanas neutras de *S. oblongus*

(29, 31), *M. paranaguensis* (81), e, dos polissacarídeos de moluscos do gênero *Biomphalaria* (65).

A análise de metilação indica para os polissacarídeos de *M. cornuarietis* uma estrutura mais complexa do que a dos polímeros de *P. lineata*. Os grupos terminais desses polissacarídeos (F.AC, Tabela VII) são constituídos de *L*-fucopiranosídeo (5 moles %), 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-galactopiranosose (5 moles %) e de *D*-galactopiranosose (30 moles %). Cadeias lineares constituídas de unidades de *D*-galactopiranosose substituídas em *O*-3 ou *O*-6 também foram observadas. Os pontos de ramificação ocorrem em *O*-3 e *O*-6 apenas das unidades de *D*-galactose. Esta fucogalactana se diferencia daquela isolada de outro molusco por não conter unidades substituídas em *O*-2.

A análise por g.l.c., espectrometria de massa (impacto de electron, E.I.) dos acetatos de alditol, obtidos do polissacarídeo metilado F.A (Tabela VIII), apresenta resultados em concordância com os de metilação, conforme demonstram os dados das Fig. 1-6. Pela análise de espectrometria de massa foram identificados os seguintes derivados metilados, sendo assinalados apenas os fragmentos principais: 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-galactitol (m/e 45, 117, 161 e 205, Fig. 1, Esq. II); 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-metil-*D*-galactitol (m/e 45, 117, 189 e 233, Fig. 2, Esq. III); 1,3,5-tri-*O*-acetil-2,4,6-tri-*O*-metil-*D*-galactitol (m/e 45, 117, 161,

TABELA VIII - ANÁLISE POR g.l.c. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS DO POLISSACARÍDEO METILADO DE *P. lineata* (F.A)

LOCALIZAÇÃO DO GRUPO METIL DO GALACTITOL	TEMPO DE RETENÇÃO ^a							
	ECNSS-M				OV-225			
	F.A	F.AD-1	F.AD-2	F.AD-3	F.A	F.AD-1	F.AD-2	F.AD-3
2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-galactitol	1,25	1,25	1,25	1,25	1,19	1,19	1,19	1,19
2,4,6-tri- <i>O</i> -metil-galactitol	2,03	2,10	1,80	2,00	1,90	1,72	1,80	1,72
2,3,4-tri- <i>O</i> -metil-galactitol	2,16	2,80	2,46	2,80	2,50	2,52	2,52	2,44
2,6-di- <i>O</i> -metil-galactitol	3,06	3,10	3,36	3,00	2,70	2,72	2,72	2,71
2,4-di- <i>O</i> -metil-galactitol	5,04	5,00	4,20	4,96	4,10	4,10	4,10	4,10

^a

Tempo de retenção relativo ao 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-*D*-glucitol.

F.A = Polissacarídeo de glândula de albúmen de *P. lineata* pH 7,0.

F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3 = Polissacarídeos da primeira, segunda e terceira degradações seqüenciadas tipo Smith da glândula de albúmen de *P. lineata*.

A análise por g.l.c. nas colunas r e s.

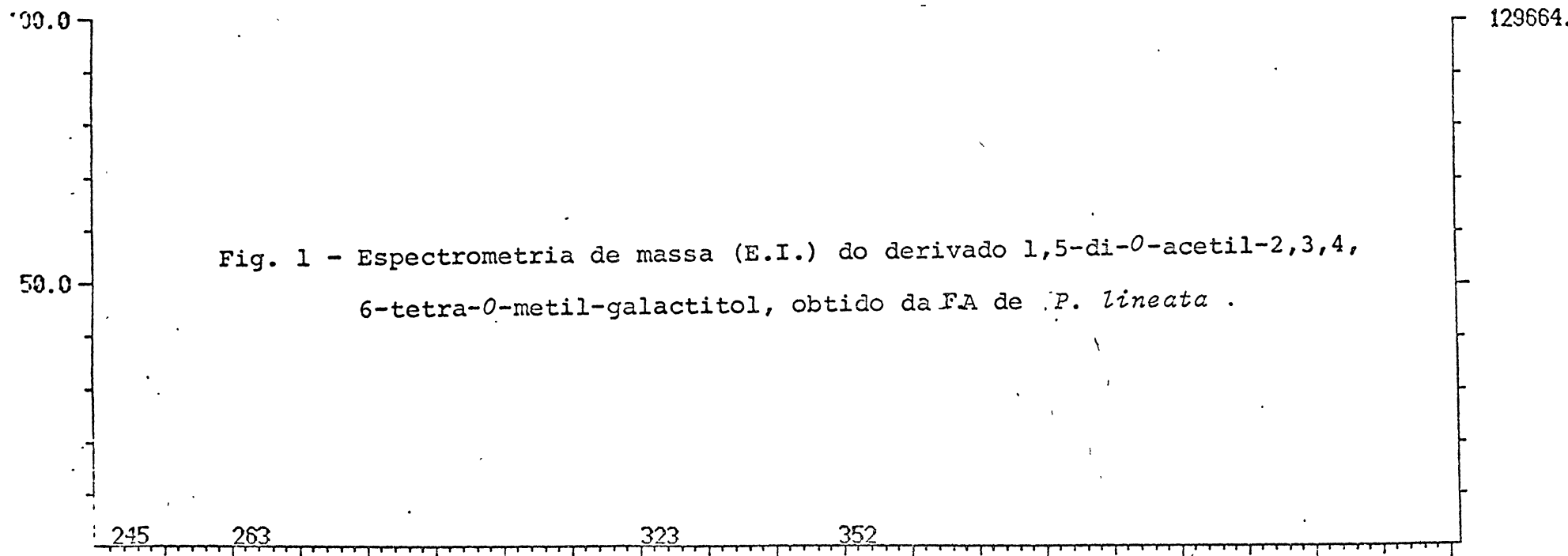
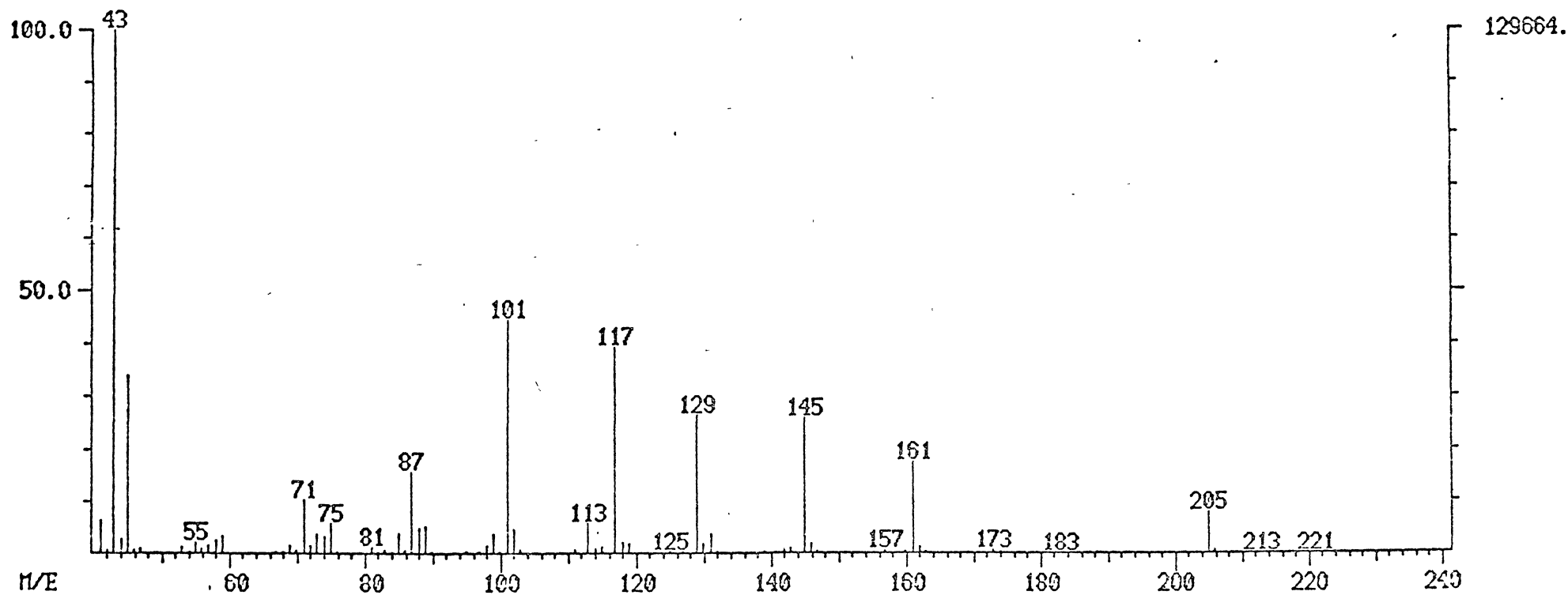


Fig. 1 - Espectrometria de massa (E.I.) do derivado 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-galactitol, obtido da FA de *P. lineata*.

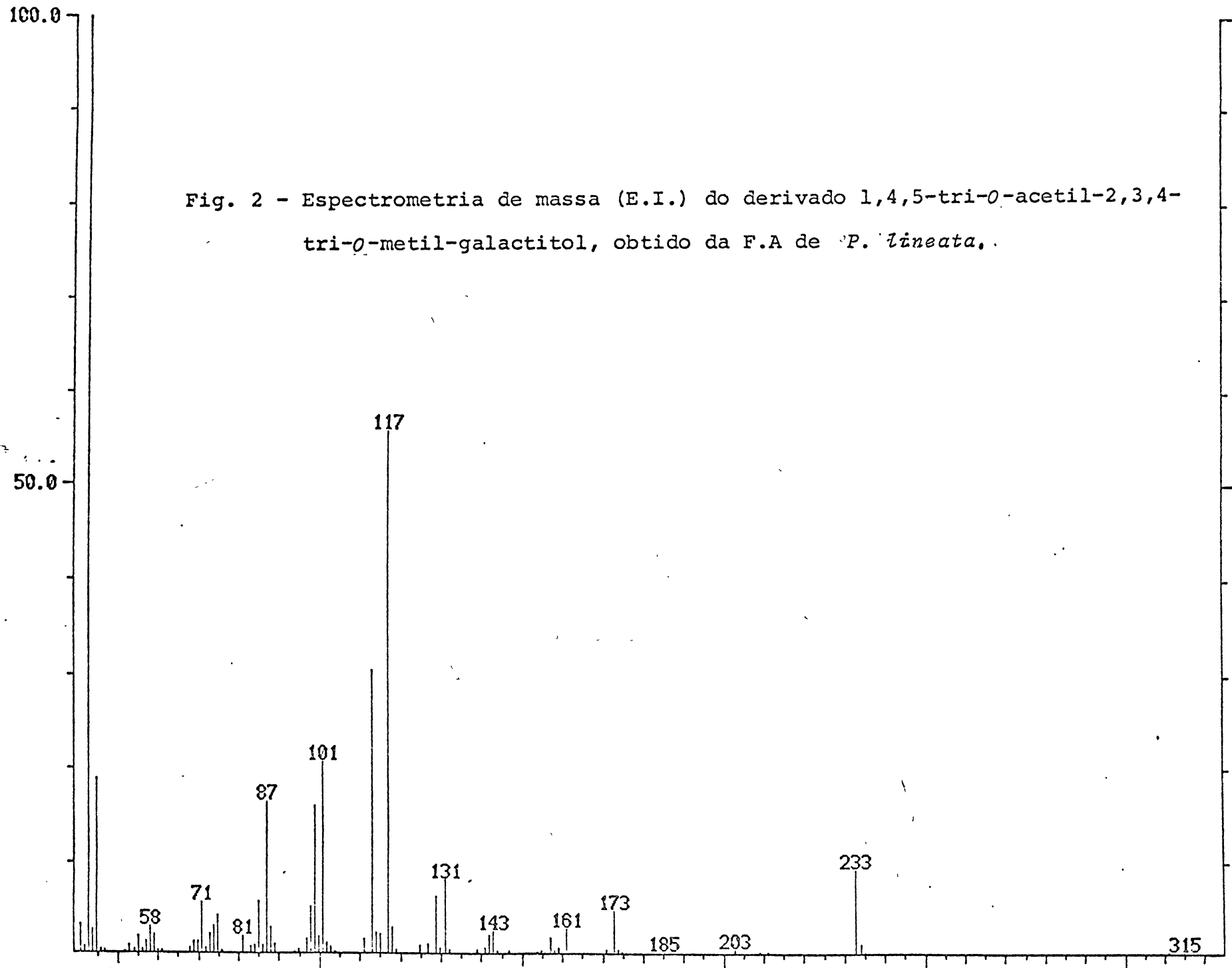
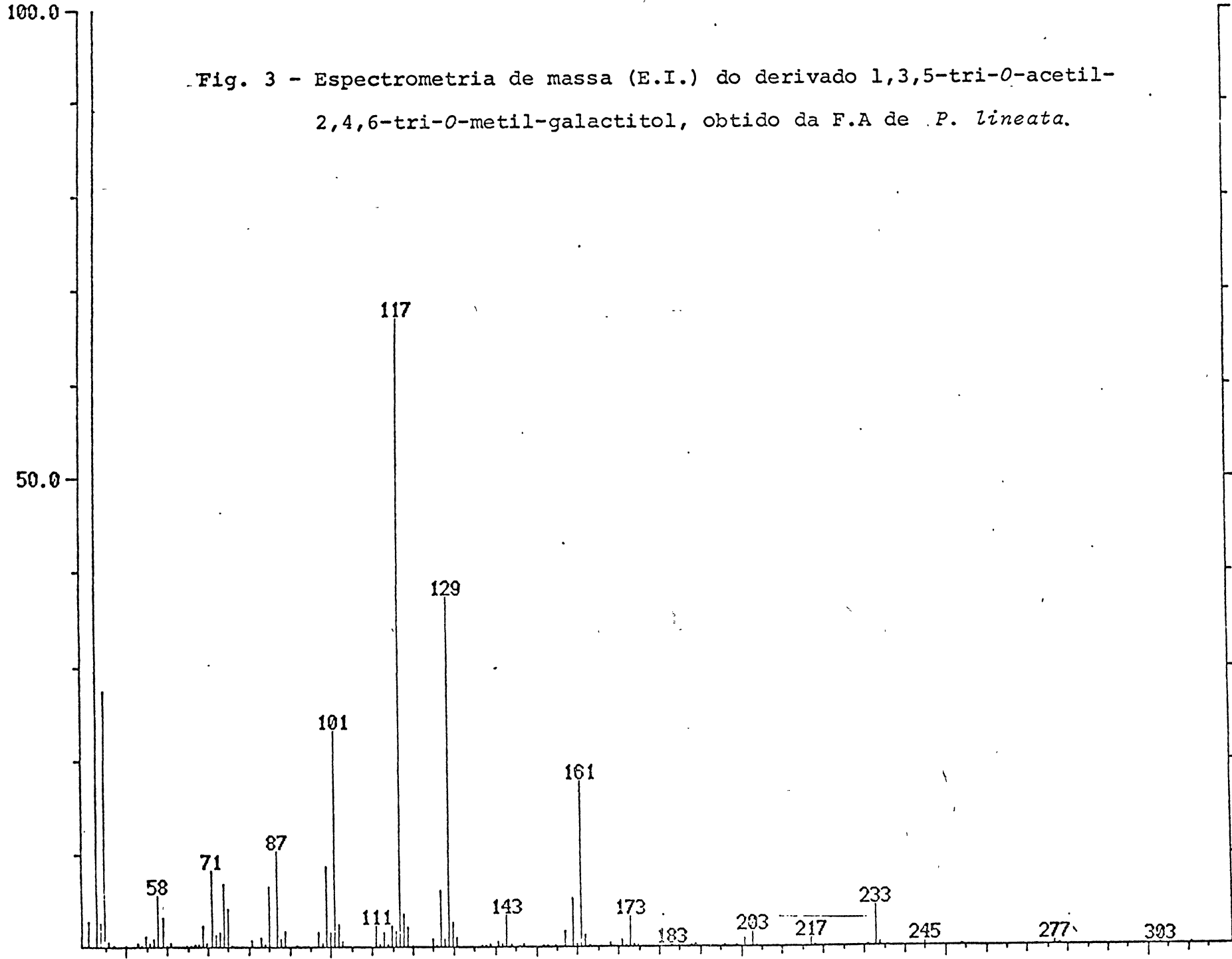


Fig. 2 - Espectrometria de massa (E.I.) do derivado 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-galactitol, obtido da F.A de *P. lineata*.

Fig. 3 - Espectrometria de massa (E.I.) do derivado 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-galactitol, obtido da F.A de *P. lineata*.



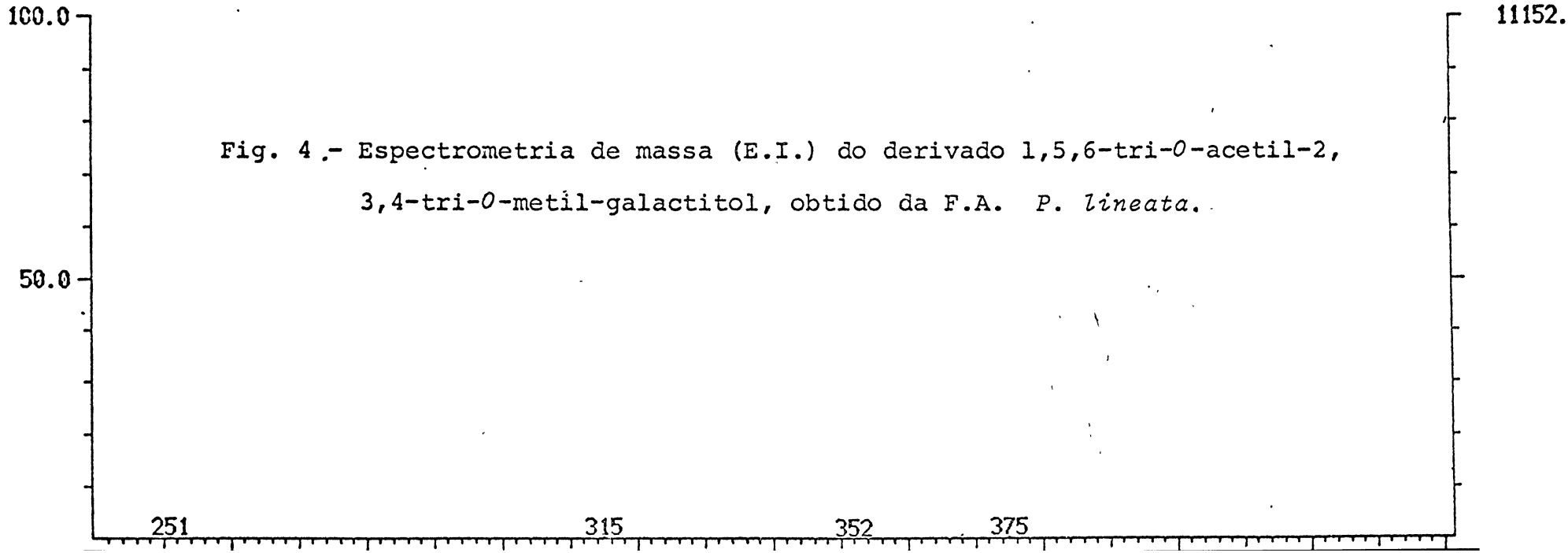
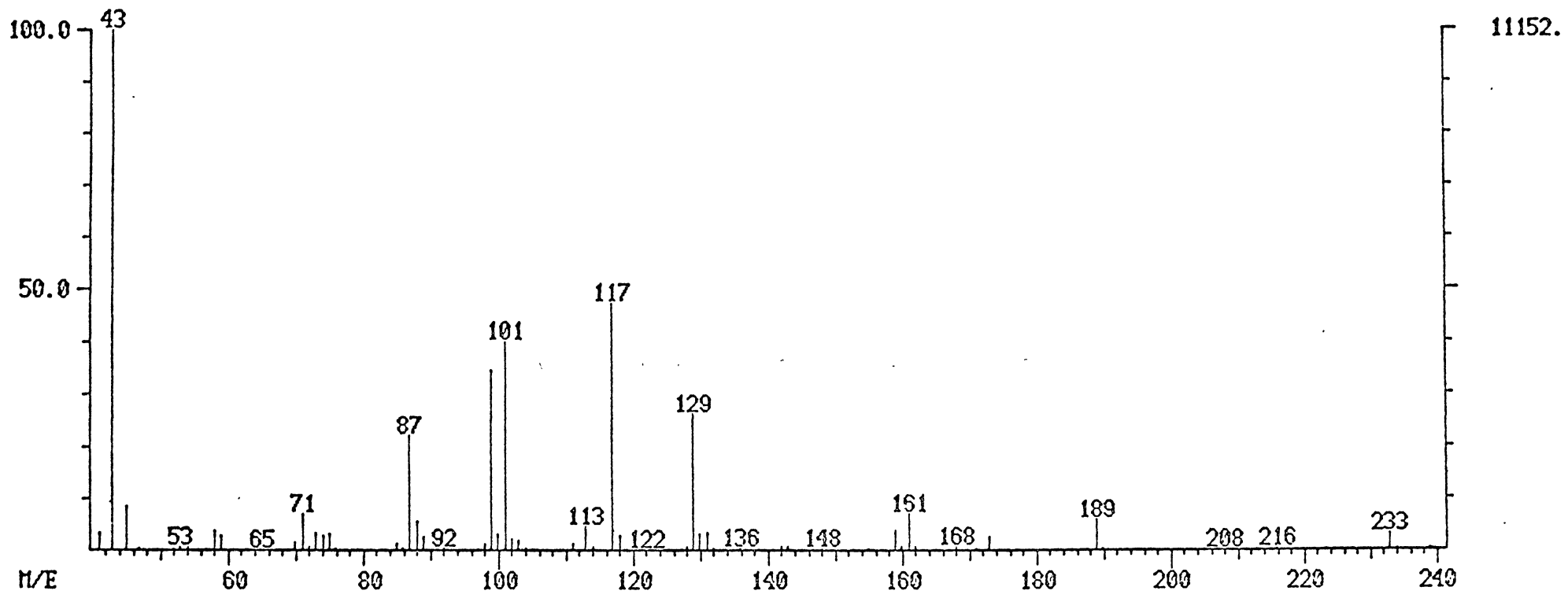


Fig. 4.- Espectrometria de massa (E.I.) do derivado 1,5,6-tri-*O*-acetil-2, 3,4-tri-*O*-metil-galactitol, obtido da F.A. *P. lineata*.

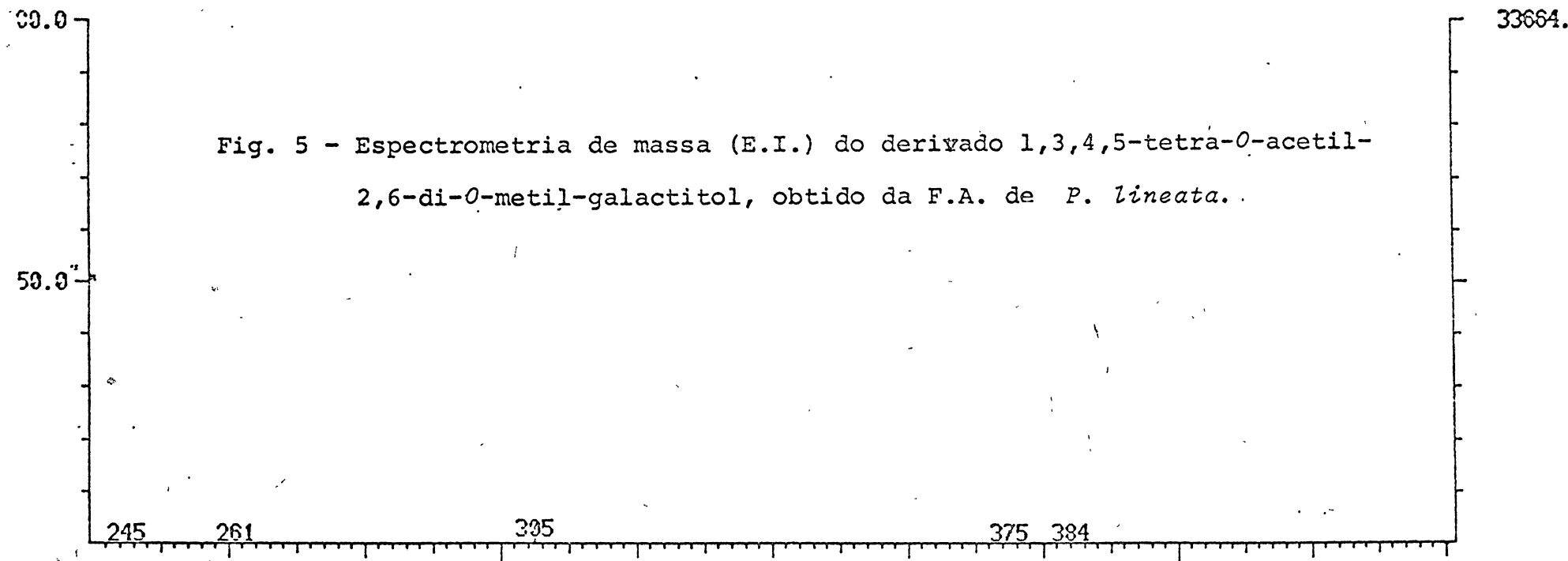
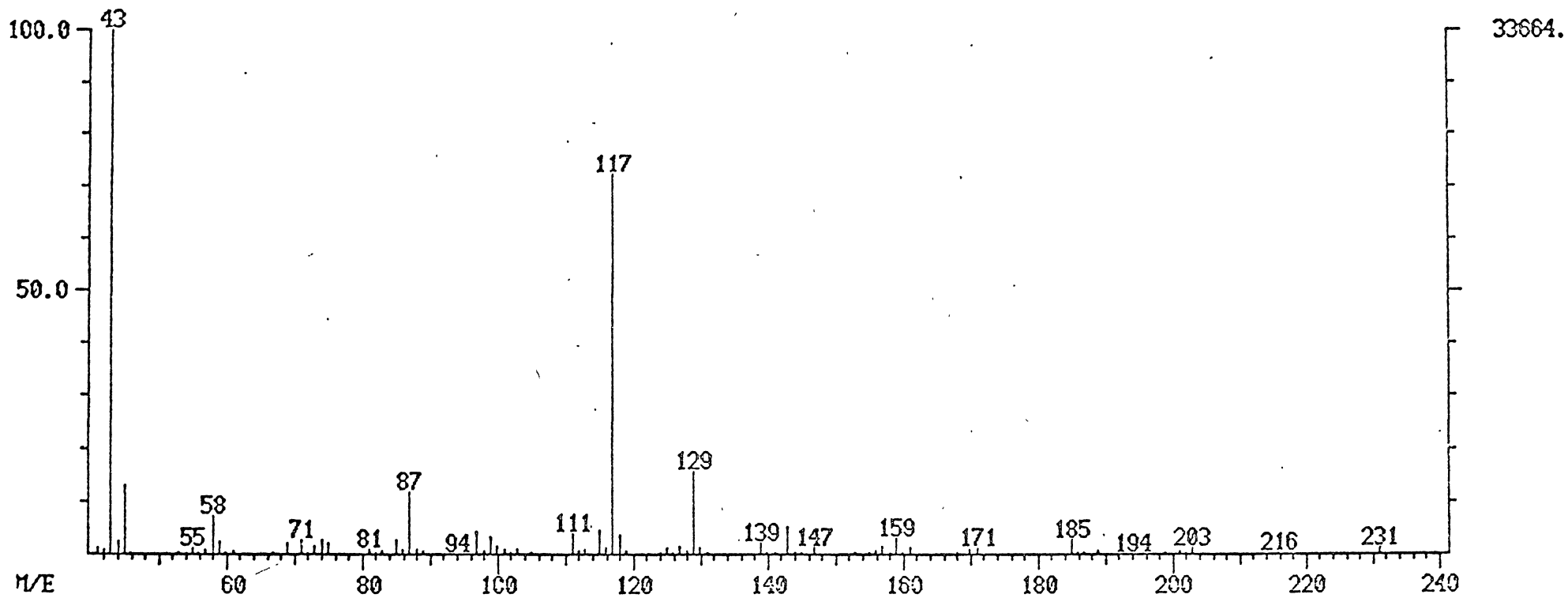
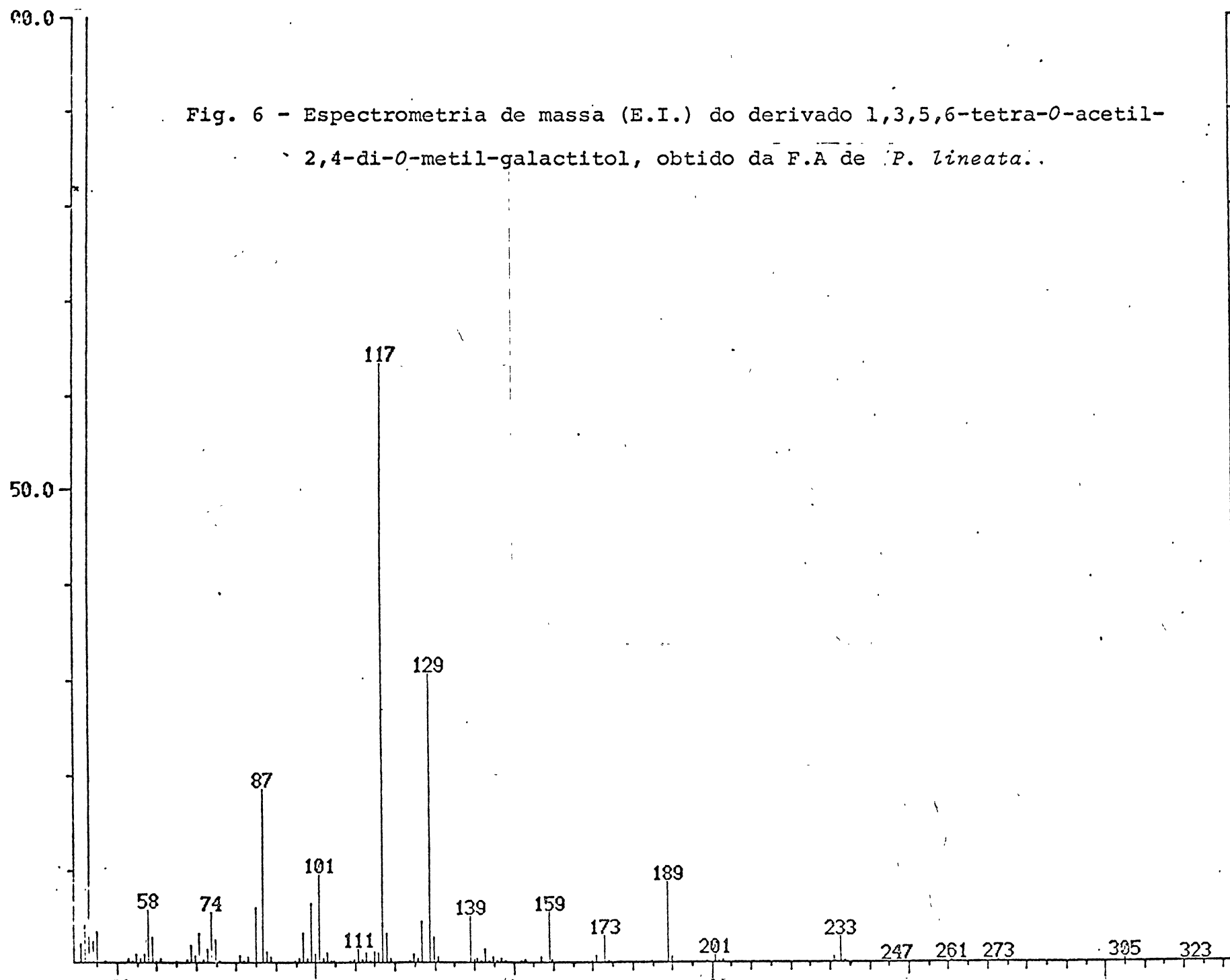
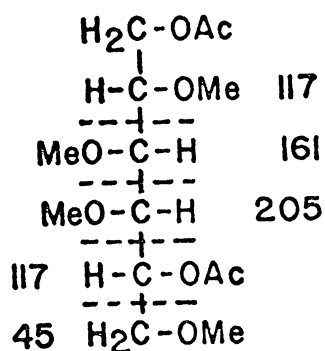


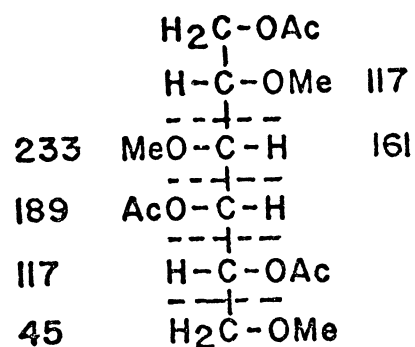
Fig. 5 - Espectrometria de massa (E.I.) do derivado 1,3,4,5-tetra-*O*-acetil-2,6-di-*O*-metil-galactitol, obtido da F.A. de *P. lineata*.

Fig. 6 - Espectrometria de massa (E.I.) do derivado 1,3,5,6-tetra-*O*-acetil-
2,4-di-*O*-metil-galactitol, obtido da F.A de *P. lineata*..

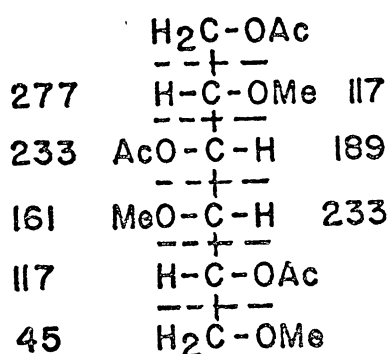




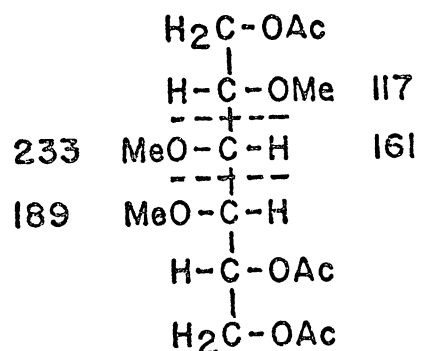
Esquema II



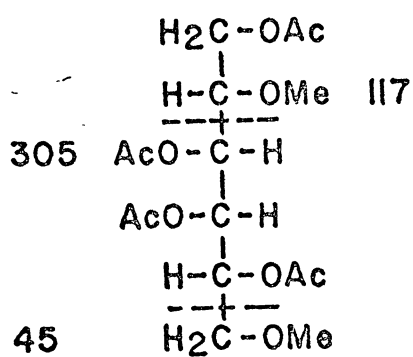
Esquema III



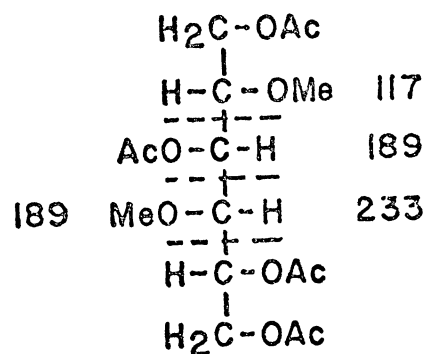
Esquema IV



Esquema V



Esquema VI



Esquema VII

189, 233, 277, Fig. 3, Esq. IV); 1,5,6-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-*D*-galactitol (m/e 117, 161, 189 e 233 (Fig. 4, Esq. V); 1,3,4,5-tetra-*O*-acetil-2,6-di-*O*-metil-*D*-galactitol (m/e 45, 117 e 305, Fig. 5, Esq. VI); 1,3,5,6-tetra-*O*-acetil-2,4-di-*O*-metil-*D*-galactitol (m/e 117, 189 e 233, Fig. 6, Esq. VII).

Os dados de espectrometria de massa dos derivados metilados (acetato de alditol), obtidos dos polissacarídeos de *P. lineata*, estão de acordo com os da literatura (20).

As frações F.AC, F.BC de *M. cornuarietis* também foram analisadas por g.l.c., espectrometria de massa (acetato de alditol, parcialmente metilado). Os resultados foram semelhantes aos obtidos com a F.A, com exceção da presença de *L*-fucopirranose, observada em F.AC e F.BC.

OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata* E DE *M. cornuarietis*.

Os polissacarídeos de *P. lineata* e de *M. cornuarietis* (F.A, F.B, F.AC e F.BC, respectivamente), quando submetidos à oxidação com meta-periodato, apresentam valores para consumo de meta-periodato e liberação de ácido fórmico, que se encontram na Tabela IX. Todas as unidades oxidadas por meta-periodato liberam ácido fórmico numa relação molar de 2:1. Estes dados, em conjunção com a ausência de treitol na análise

TABELA IX - OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO DE SÓDIO DOS POLISSACARÍDEOS DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *P. lineata* e *M. cornuarietis*.

FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS ^a	MOLES DE PERIODATO CONSUMIDO POR MOL DE HEXOSE ANIDRA ^b	MOLES DE ÁCIDO FÓRMICO PRODUZIDO POR MOL DE HEXOSE ANIDRA ^c	RELAÇÃO MOLAR PERIODATO/ÁCIDO FÓRMICO
F.A	1,1	0,55	2:1
F.B	1,1	0,52	2:1
F.A desacetilada	1,1	0,52	2:1
F.B desacetilada	1,1	0,52	2:1
F.AD-1	0,7	0,40	2:1
F.AD-2	0,5	0,30	2:1
F.AD-3	0,4	0,20	2:1
F.AC	0,8	0,40	2:1
F.BC	0,8	0,40	2:1

a

F.A e F.B = Polissacarídeos de *P. lineata*; F.A e F.B foram desacetiladas como descrito em material e métodos; F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3 correspondem aos polissacarídeos recuperados durante a 1^a, 2^a e 3^a. degradações seqüenciadas tipo Smith do polissacarídeo F.A de *P. lineata*.

F.AC e F.BC = Polissacarídeos de *M. cornuarietis*.

b

Determinado pelo método de Neumüller e Vasseur (83).

c

Determinado por titulação com NaOH 0,01 M (9).

se tipo Smith, dos grupos terminais (Tabela X), permitem excluir substituição em 0-4 (ligação glicosídica) nos polissacarídeos de *P. lineata* e *M. cornuarietis*.

Os resultados da metilação, conjuntamente com os dados da Tabela X (presença apenas de galactose-glicerol), excluindo substituição em 0-2 e 0-4, indicam que, nesses polímeros, as unidades suscetíveis à oxidação com meta-periodato se localizam, principalmente, nas extremidades não redutoras e em certas unidades internas que apresentam substituição em 0-6.

Não houve diferença apreciável no consumo de meta-periodato e ácido-fórmico liberado dos polissacarídeos F.A e F.B com e após remoção do grupo acetil (1,0 mol de meta-periodato e 0,5 mol de ácido liberado por mol de hexose anidra, Tabela X). Esses resultados não foram suficientes para elucidar a localização do grupo acetil nesses polímeros, necessitando uma investigação mais específica para tal fim.

DEGRADAÇÃO SEQUENCIADA TIPO SMITH DOS POLÍMEROS DE *P. lineata*.

Os polímeros da degradação seqüenciada, tipo Smith da F.A, foram analisados por oxidação com meta-periodato, pela análise tipo Smith dos grupos terminais e processos de metilação. Após três degradações sucessivas, o polímero foi

TABELA X - ANÁLISE TIPO SMITH DOS GRUPOS TERMINAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. lineata* e *M. cornuarietis* POR g.l.c.

ACETATOS DE ALDITÓIS	T ^a	MOLES %						
		F.A	F.B	F.AD-1	F.AD-2	F.AD-3	F.AC	F.BC
Glicerol	0,27	50	50	40	30	25	40	40
Galactitol	1,60	50	50	60	70	75	60	60
Galactitol/Glicerol	-	1:2,34	1:2,34	1:1,38	1,17;1	1,78:1	1:3,55	1:3,55

^a Tempo de retenção relativo ao xilitol pentacetato (coluna t).

F.A e F.B = Polissacarídeos de *P. lineata*, obtidos pela precipitação fracionada com cetavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3 = Polissacarídeos obtidos de F.A segundo o processo de degradação se-
qüenciada tipo Smith (primeira, segunda e terceira degradações).

F.AC e F.BC = Polissacarídeos de *M. cornuarietis*, obtidos da precipitação fracionada com ce-
tavlon em pH 7 e 8,5, respectivamente.

recuperado numa percentagem de 6,5% para F.A e 6,6% para F.B. (Tabela XI). Durante o processo degradativo, observou-se um aumento crescente de unidades substituídas em 0-3, como demonstram os dados de metilação (11 moles % em F.A e 52 moles % do polímero recuperado na terceira etapa do processo degradativo, F.AD-3, Tabela V). O aumento de unidades substituídas em 0-3, nos polímeros recuperados, do processo degradativo, está de acordo com a diminuição do consumo de meta-periodato e ácido fórmico liberado, observado nesses polímeros (Tabela IX).

A diminuição acentuada da percentagem de glicerol das frações F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3 é outra evidência do aumento crescente de unidades 0-3 substituídas nesses polímeros. Durante o processo de degradação oxidativa da F.A., observou-se, ainda, uma diminuição acentuada dos grupos terminais não redutores, e uma grande oscilação, na percentagem das unidades distribuídas em 0-6 (Tabela V) nos polímeros recuperados (F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3). Os resultados da degradação sequenciada tipo Smith do polímero de *P. lineata* (F.A) são muito semelhantes àqueles observados por Diaz-Segura e Duarte (29), quando investigaram a galactana de *S. oblongus*. Segundo estes autores, o aumento das unidades substituídas em 0-3 e as oscilações percentuais de unidades substituídas em 0-6 são derivadas à remoção (hidrólise suave das unidades suscetivas à oxidação com meta-periodato) de grupos terminais não redutores, de unidades substituídas (em 0-3 e 0-6) que estão localizadas nas camadas mais externas do polímero (mecanismo de po

TABELA XI - RENDIMENTO EM POLISSACARÍDEO DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *P. lineata*, APÓS DEGRADAÇÃO SEQUENCIADA TIPO SMITH.

NÚMERO DE ETAPAS DEGRADATIVAS	POLISSACARÍDEOS		POLISSACARÍDEOS RECUPERADOS		MATERIAL DIALISÁVEL (g)			
	F.A (g)	F.B (g)	F.A %	F.B %	F.A ^b		F.B ^b	
					Neutro	Ácido	Neutro	Ácido
	10,0	9,0						
Primeira	5,5	4,5	55,0	50,0	3,1	0,8	3,0	0,6
Segunda	2,0	1,9	20,1	21,0	2,7	0,4	1,9	0,3
Terceira	0,6	0,6	6,5	6,6	0,9	0,2	0,9	0,2

a
A percentagem de polissacarídeo, em peso seco, foi calculada em relação ao polissacarídeo original.

b
Frações ácidas e neutras obtidas após fracionamento em coluna DOWEX 1 x 8, 200-400 mesh, for ma acetato eluída com água (neutra) e ácido acético 1 N (ácida).

F.A e F.B = Polissacarídeos ácidos de *P. lineata* pH 7,0 e 8,5, respectivamente.

da). Deste modo, as unidades substituídas em 0-6, que são formadas durante uma fase do processo degradativo, são oxidadas durante a etapa subsequente do processo, tornando o polímero mais linear e rico em unidades substituídas em 0-3. Durante este processo degradativo, observou-se, também, um aumento na percentagem de unidades dissubstituídas em 0-3 e 0-4, conforme demonstra o aumento percentual do derivado 2,6-di-0-metil-D-galactose da F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3, (Tabela V). Estes derivados aparecem como tetra-0-metil-D-galactose (F.A, F.AD-1, F.AD-2 e F.AD-3), dos quais o acetal de ácido pirúvico foi previamente removido, a fim de ser submetido aos processos de metilação. O aumento de unidades dissubstituídas em 0-3 e 0-4, em galactanas da massa de ovas de *P. lineata* que foram submetidas ao mesmo processo de degradação seqüenciada tipo Smith, foi também observado por Petiz (87), que demonstrou ser este aumento paralelo ao de acetal de ácido pirúvico. Vale ressaltar que, durante o processo de degradação, apenas uma pequena percentagem de galactosil-glicerol, contendo acetal de ácido pirúvico foi liberada, cuja estrutura não foi estabelecida.

Com base nos dados de metilação (ausência de derivado mono-metil-D-galactose), da degradação oxidativa (aumento crescente de unidades dissubstituídas em 0-3 e 0-6), e de espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. (a ser discutido posteriormente) indicaram que o acetal de ácido pirúvico esteja ligado a certas unidades terminais não redutoras dos polímeros. A distri

buição dessas unidades nos segmentos da molécula não foi ainda estabelecida.

A presença de acetal de ácido pirúvico em polissacarídeo tem sido correlacionada por diversos autores (36, 56) com sua atividade imunológica. No presente trabalho, não foi realizado nenhum experimento com tal finalidade.

DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DO ACETAL DE ÁCIDO PIRÚVICO NO POLISSACARÍDEO DE *P. lineata*.

A espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono-13 (^{13}C -n.m.r.) pode ser usada para determinar o tamanho dos anéis dos acetais cíclicos. Stoddart (100) relatou que acetais metilênicos, contendo anéis de 5-, 6- e 7 membros, dão sinais de ressonância com deslocamentos químicos típicos do carbono do acetal. Diferenças foram mostradas entre as ressonâncias de acetais, como do 1,2-*O*-isopropilideno-etanodiol (δ_{C} 108,5), do 1,3-*O*-isopropilideno-1,3-propanodiol (δ_{C} 97,9) e do 1,4-*O*-isopropilideno-1,4-butanodiol (δ_{C} 100,9). Valores comparáveis foram observados, e têm sido usados para outros derivados isopropilidênicos para verificar o tamanho do anel (7,24). Os anéis de 5 membros do *O*-[1-(hidroximetil)etilideno], apresentando um sinal de ressonância do carbono não protonado do acetal com δ_{C} 100,0 são perfeitamente distinguíveis daqueles de acetais de 6 membros (44), que apresentam

sinais de δ_c 99,0-101,5. Existe, também uma correlação entre a configuração e o deslocamento químico dos sinais de ressonância de ^{13}C do CH_3 de certos grupos de acetais de 6 membros, por exemplo: os derivados do 4,6-*O*-[1-(acetoximetil)etilideno], do 4,6-*O*-(1-carboxietilideno) e do 4,6-*O*-[1-(metoxicarbonyl)etilideno] de metil galactosídeo, que dão sinais de δ_c 24,7 - 26,0, quando o grupo metil é equatorial, e de δ_c 15,1 - 18,3, quando é axial (43), em relação do anel de 1,3-dioxana. Foram observadas que as diferenças da configuração nos 3,4-*O*-[1-(acetoximetil)etilideno] e 3,4-*O*-[1-(hidroximetil)etilideno], causam somente pequenas diferenças no deslocamento do CH_3 (43, 44). Estas pequenas diferenças têm sido atribuídas à mobilidade conformacional do anel e da disposição quase equatorial e axial dos grupos CH_3 (7).

O presente estudo trata da determinação de vários parâmetros espectrais de ^{13}C -n.m.r. e ^1H -n.m.r. de compostos estruturalmente relacionados às unidades de 3,4-*O*- e 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)-*D*-galactopiranosil, que ocorrem em certos polissacarídeos (11, 13, 22, 28, 32 e 84). Estes incluem deslocamentos químicos (Tabelas XII e XIII), tempo de relaxamento longitudinal (Tabela XIV), efeito nuclear de "Overhauser" (n.o.e.) (Tabela XV) e, para uns poucos sinais, alargamento de seus picos de ressonância "line broadening".

Com a ajuda dos deslocamentos químicos, é possível determinar a posição da substituição e configuração dos acetais de ácido pirúvico na β -*D*-galactopiranosil de *P. lineae*

TABELA XII - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS POR ^{13}C -n.m.r. (δ_{C} , em p.p.m.) DE ACETAIS DERIVADOS DE HEXAPIRANOSÍDEOS.

C O M P O S I T O S	CARBONIL	ÁTOMOS DE CARBONO - ACETAL NÃO PROTONADO	C-1	CH ₃ DO ACETAL
Metil 6- <i>O</i> -benzil-3,4- <i>O</i> -[1-(hidroximetil)etilideno]- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>3</u> (D ₂ O)		111,88	103,86	21,94
Metil 3,4- <i>O</i> -[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo do <u>3</u> (CDCl ₃)	169,96	106,47	103,31	23,60
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>6</u> (D ₂ O)	178,41	107,24	103,68	24,53
Sal de bário do composto <u>6</u> (D ₂ O, 70°)	178,49	109,60	104,31	24,98
Metil 3,4- <i>O</i> -[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo do <u>4</u> (CDCl ₃)	170,05	106,06	103,23	23,49
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>5</u> (D ₂ O)	175,37	107,44	103,79	24,06
Sal de bário do composto <u>5</u> (D ₂ O, 70°)		109,45	104,47	25,05
Metil 3,4- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (D ₂ O)		112,03	103,96	28,38 26,62
Maior isômero do metil 3,4- <i>O</i> -[1-(hidroximetil)etilideno]- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo (D ₂ O, 70°)		111,81	104,47	22,56
Metil 3,4- <i>O</i> -[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo (CDCl ₃)	170,05	106,02	103,18	16,54
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo <u>8</u> (D ₂ O)	174,76	106,81	103,61	23,99
Sal de bário do composto <u>8</u> (D ₂ O, 70°)	178,60	109,21	104,11	24,89
Menor isômero do metil 3,4- <i>O</i> -[1-(hidroximetil)etilideno]- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo		111,64	104,48	24,15
Metil 3,4- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo		111,93	104,50	28,86 27,09
4,6- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (sal de bário; D ₂ O, 70°)	177,32	102,39	97,76 94,43	26,96
3,6-anidro-4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosil]- <i>L</i> -galactose dimetil acetal (D ₂ O)	175,03	100,46	105,74 103,25	26,12
Sal de bário anterior (D ₂ O)	177,05	101,87	105,75 103,21	26,31
Metil 4,6- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (D ₂ O)		100,73	104,46	29,45 19,05

TABELA XIII - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS PRÓTONS DO GRUPO METIL DO ACETAL DOS DERIVADOS DE 3,4-0-(1-CARBOXIETILIDENO) POR $^1\text{H-n.m.r.}$

C	O	M	P	O	S	T	O	S	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DO CH ₃ DO ACETAL. δ , em p.p.m.
Metil	3,4-0-	(1-carboxietilideno)-	β -D-	galactopiranosídeo	<u>6</u>	(D O)			1,94
					2				
Metil	3,4-0-	(1-carboxietilideno)-	β -D-	galactopiranosídeo	<u>5</u>	(D O)			2,04
					2				
Sal de bário do composto					<u>6</u>	(D O)			1,87
					2				
Sal de bário do composto					<u>5</u>	(D O)			1,97
					2				
Sal de bário do composto					<u>6</u>	(D O, 70°)			1,97
					2				
Sal de bário do composto					<u>5</u>	(D O, 70°)			2,07
					2				
Sal de bário da galactana piruvilada de <i>P. lineata</i>						(D ₂ O, a 70°)			1,99

TABELA XIV - TEMPOS DE RELAXAMENTO LONGITUDINAL, T_1 , DOS ÁTOMOS DE CARBONO EM VÁRIOS ACETAIS

C O M P O S T O S	TEMPOS DE RELAXAMENTO LONGITUDINAL, T_1 (s) (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS, δ_C , EM PARÊNTESES)					
	Carbonil	Átomo de Carbono não protonado do Acetal	Átomo de Carbono Mono-protonados	C-6	OCH ₃	CH ₃ DO ACETAL
Metil 3,4- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (D ₂ O, 34°)	10,4 (112,03)	0,79-0,82 (73,79-103,96)	0,51 (62,02)	2,2 (58,16)	0,91, 0,68 (28,38) (26,62)	
Metil 3,4- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (D ₂ O, 52°)	16,8	1,4	0,85	3,4	1,2, 1,0	
Metil 3,4- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (D ₂ O, 70°)	23,3	2,0-2,1	1,2	5,1	1,7, 1,5	
Metil 6- <i>O</i> - β - <i>D</i> -galactopiranosil-3,4- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (D ₂ O, 34°)	5,7 (112,10)	0,33-0,54 (69,80-103,96)	0,40 (62,04)	1,5 (58,39)	0,66, 0,51 (28,36) (26,63)	
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>6</u> (Sal de bário, D ₂ O)	10,8 (178,41)	10,0 (109,04)	0,44-0,72 (72,12-103,68)	0,44 (62,09)	1,6 (58,20)	0,70 (24,53)
3,6-Anidro-4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosil]- <i>L</i> -galactose dimetil acetal	5,2 (175,03)	6,8 (100,46)	0,32-0,44 (66,93-105,74)	0,11-0,18 (74,11) (66,23)	1,6 (56,81) (56,10)	0,51 (26,12)
Sal de bário anterior (D ₂ O)	7,7 (177,15)	5,8 (101,87)	0,22-0,34 (67,23-105,75)	0,11-0,22 (62,97) (74,11)	1,5, 1,4 (56,85) (56,10)	0,47 (26,31)
Metil éster anterior (acetona-d ₆)	7,7 (171,04)	6,5 (99,01)	0,22-0,38 (66,44-105,32)	0,11 (65,90) (74,56)	1,7, 1,1 (54,04) (52,59) (55,33)	0,57 (26,04)
Maior Isômero do metil 3,4- <i>O</i> -[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo (CDCl ₃)	26,2 (170,05)	15,04 (105,87)	0,79-1,01 (68,52-103,14)	0,77 (16,47)	2,4, 3,0 (56,76) (52,73)	0,67 (23,46)
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo <u>8</u> (sal de bário, D ₂ O)	13,1 (178,48)	11,7 (108,66)	0,44-0,60 (69,92-103,48)	0,57 (16,87)	1,76 (58,12)	0,60 (24,54)

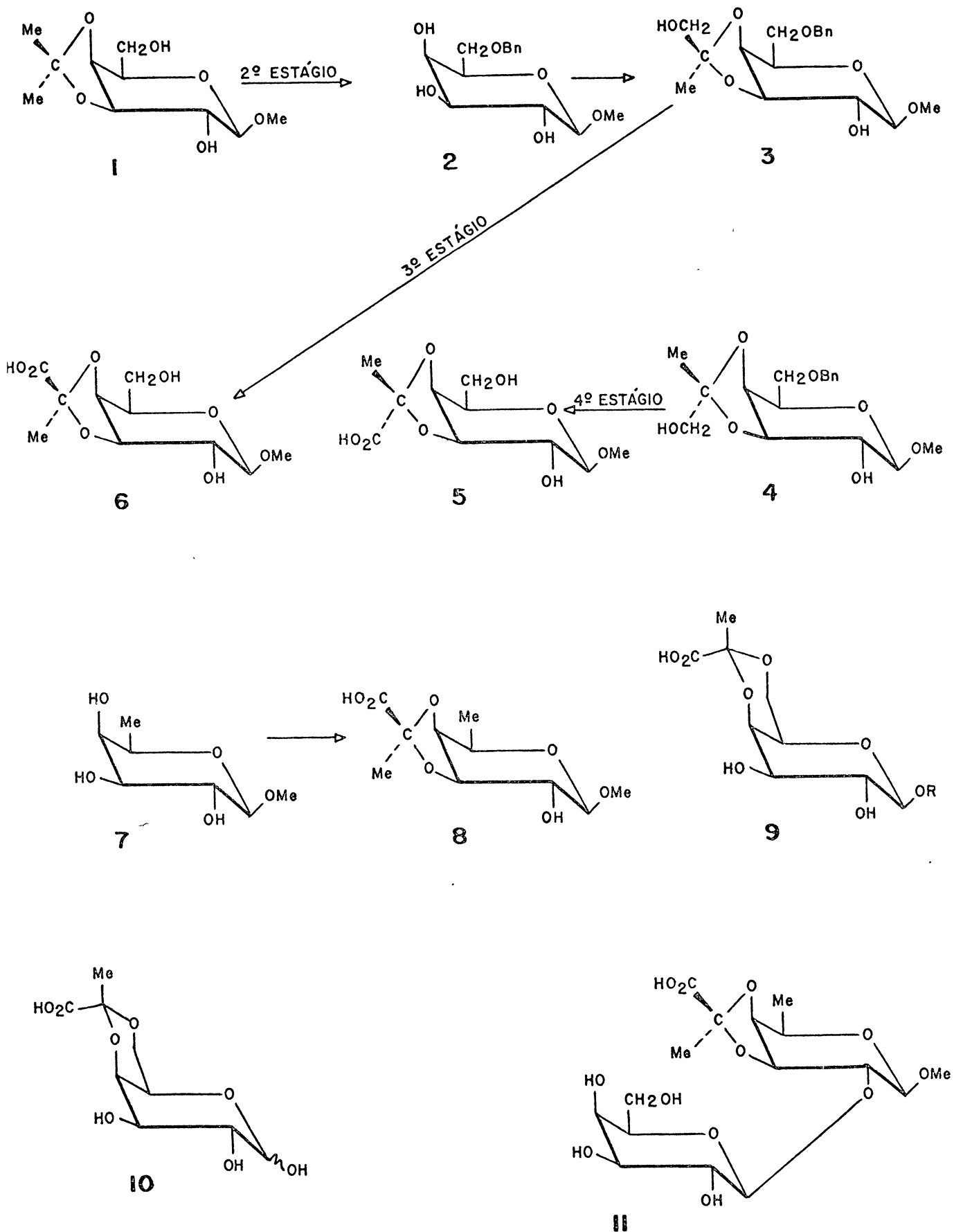
TABELA XV - VALORES DO EFEITO NUCLEAR DE "OVERHAUSER" (n.O.e.) DE CARBONOS EM VÁRIOS ACETAIS.

C O M P O S T O S	VALORES DE n.O.e. DOS NÚCLEOS DOS CARBONOS (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS, δ_C , DOS SINAIS EM PARENTESIS)					
	Carbonil	Átomo de Carbono - não Protocado do Acetal	Átomos de Carbono - Mono-protonados	C-6	OCH ₃	CH ₃ DO ACETAL
Metil 4,6- <i>O</i> -isopropilideno- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (D ₂ O)		2,9 (100,73)	2,8-3,3 (67,34-104,46)	3,3 (63,39)	2,6 (58,17)	2,9, 2,8 (29,45) (19,05)
4,6- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- α - β - <i>D</i> -galactose (sal de bário, D ₂ O)	1,2 (177,15)	- (101,86)	2,4-2,9 (66,15-97,18)	2,6 (63,20)		2,85 (26,40)
3,6-Anidro-4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosil]- <i>L</i> -galactose dimetil acetal (sal de bário, D ₂ O)	2,5 (177,15)	2,6 (101,87)	2,5-3,1 (67,23-105,75)	2,1, 2,6 (65,96) (74,11)	2,2, 2,1 (56,85) (56,85)	2,5 (26,31)
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>6</u> (sal de bário, D ₂ O)	1,4 (178,41)	2,3 (109,04)	2,6-3,1 (72,12-103,68)	3,1 (62,09)	2,5 (58,20)	2,6 (24,53)
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo <u>8</u> (sal de bário, D ₂ O)	2,4 (178,48)	2,5 (108,66)	2,6-3,0 (69,92-103,48)	2,6 (16,87)	2,6 (58,12)	2,9 (24,54)
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo <u>6</u> (forma ácida, D ₂ O)	1,3 (174,66)	3,3 (107,22)	2,4-3,3 (71,89-103,68)	3,3 (61,92)	3,0 (58,12)	3,3 (23,95)
Metil 3,4- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)- β - <i>D</i> -fucopiranosídeo <u>8</u> (forma ácida, D ₂ O)	1,5 (176,76)	2,2 (106,81)	2,4-3,1 (69,56-103,61)	2,7 (16,70)	2,3 (58,07)	3,4 (23,99)

ta. As características de tais substituições são os sinais de ressonância dos átomos de carbono não protonados dos acetais, dos C-3 das unidades β -D-galactopiranosídicas substituídas por acetais, e dos grupos CH₃ acetálicos (Fig. 7, A). Os sinais de C-3 e de CH₃ são comparativamente maiores nos espectros de ¹³C-n.m.r. dos polissacarídeos obtidos após sucessivas degradações, tipo Smith, (através de hidrólise suave) (Fig. 7, B).

Os compostos usados como modelo para as investigações nas etapas preparativas são descritas a seguir: estes incluem os isômeros 5 e 6 do metil 3,4-O-(1-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosídeo. O composto 1, o metil 3,4-O-isopropilideno- β -D-galactopiranosídeo foi seletivamente mono-O-benzilado com brometo de benzil e óxido de prata em N,N-dimetilformamida (16) para produzir a éter 6-benzílico. Este foi parcialmente hidrolisado e o resultante metil 6-O-benzil- β -D-galactopiranosídeo 2, foi tratado com o acetato de 2-oxopropil, contendo ácido sulfúrico, para dar os dois derivados isoméricos do 3,4-O-[1-(acetoximetil)etilideno]. Estes compostos foram desacetilados, produzindo dois isômeros do metil 6-O-benzil-3,4-O-[1-(hidroximetil)etilideno]- β -D-galactopiranosídeos 3 e 4, numa relação de 3,3:1, como indicado pelas áreas dos sinais dos espectros de ¹³C-n.m.r. com δ_c 21,94 e 23,60.

De acordo com Garegg et al. (43), baseados numa determinação cristalográfica não publicada, o maior sinal de δ_c 21,94, com o menor valor do deslocamento, deveria corres



R = 4-O-Substituido 3,6-anidro-L-galactose-dimetil acetal

ESQUEMA VIII

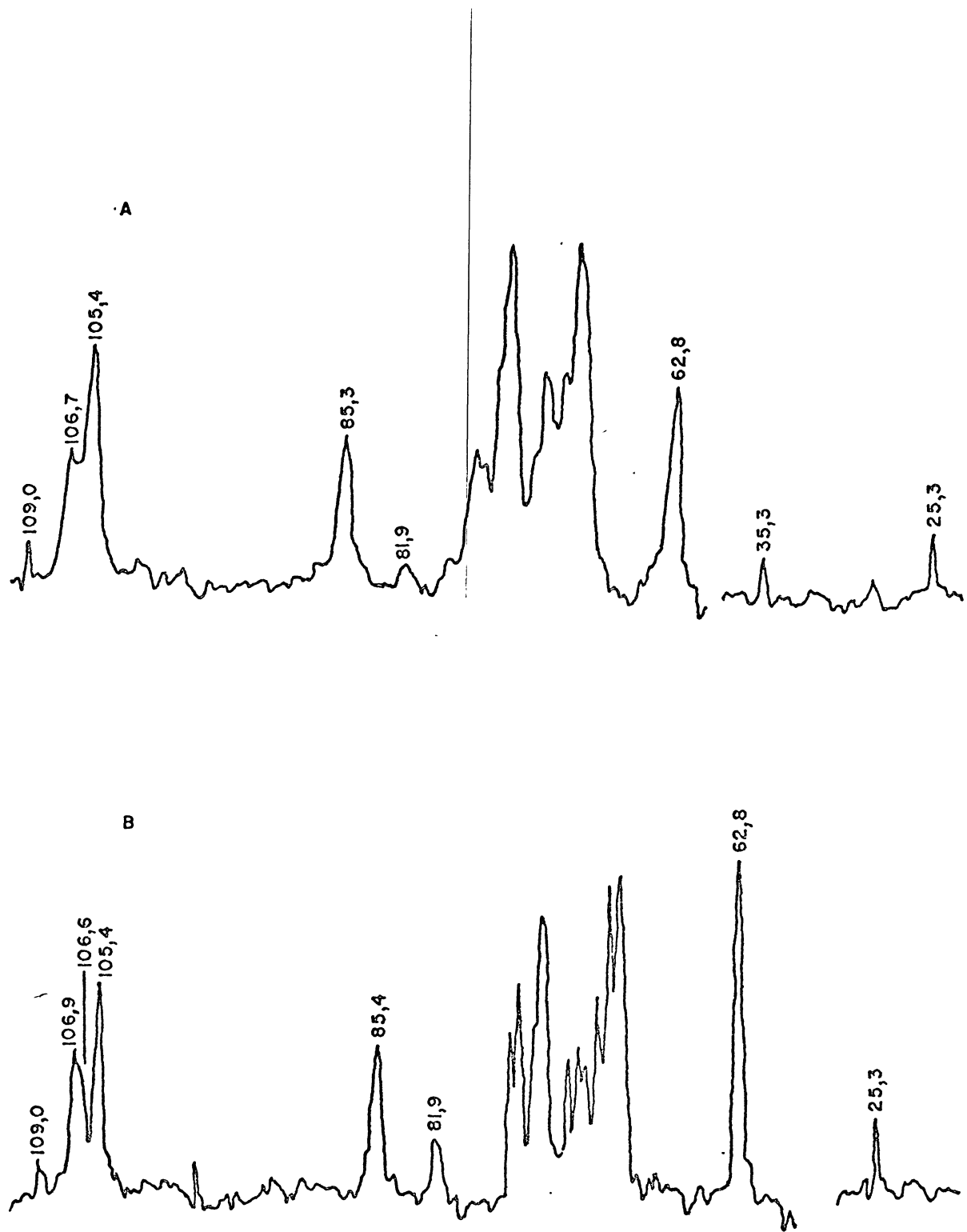


Fig. 7 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. da β -D-galactopirana de *P. lineata* (A) e do material obtido após duas sucessivas degradações, tipo Smith (B). Os espectros dos polissacarídeos (sal de bário) foram obtidos a 70° , usando-se D_2O como solvente. Os valores numéricos representam os deslocamentos químicos expressos em δ_{C} (p.p.m.).

ponder ao CH_3 do grupo 1-(hidroximetil)etilideno, com a configuração endo-hidroximetil, como no composto 3. O isômero mais abundante foi purificado por cristalização e oxidado com oxigênio na presença de platina, dando o sal de sódio do derivado 3,4-*O*-(1-carboxietilideno), o qual foi convertido na forma ácida, e em seguida, no derivado éster metílico com diazometano. Este composto foi purificado por cromatografia em coluna de ácido sílicico e hidrogenolizado com paládio, absorvido em carvão para remover o grupo *O*-benzil, fornecendo o isômero mais abundante do metil 3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β -*D*-galactopiranosídeo. O éster metil do isômero menos abundante foi preparado partindo da solução original, obtida da cristalização do composto 3. Uma série de reações foi feita, seguida de cromatografia em coluna de ácido sílicico, da mistura dos metil 3,4-*O*-[1-(metoxicarbonil)etilideno]- β -*D*-galactopiranosídeo. Cada éster metílico foi convertido no derivado do sal de bário do 3,4-*O*-(1-carboxietilideno) com uma solução de hidróxido de bário a fria e ambos foram transformados na forma de ácidos livres 5 e 6, usando-se resina trocadora de cátion.

Uma série de reações similares foram realizadas, partindo-se do metil β -*D*-fucopiranosídeo 7. Este composto deu origem a dois isômeros do metil 3,4-*O*-[1-(hidroximetil)etilideno]- β -*D*-fucopiranosídeo numa relação de 5:1, de acordo com os sinais de ^{13}C -n.m.r. dos grupos CH_3 dos acetais com δ_{C} 22,56 e 24,15. Cada isômero foi obtido cristalino, e o componente mais abundante foi convertido no derivado metil 3,4-*O*-

[1-(metoxycarbonil)etilideno]- β -*D*-fucopiranosídeo, o qual foi transformado no seu derivado correspondente, 3,4-*O*-(1-carboxietilideno) (sal de bário) e no ácido livre, composto 8.

Os deslocamentos químicos do átomo de carbono não protonado do acetal do metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeos 6 e 5, apresentam valores de δ_c 107,24 e 107,44, respectivamente, de acordo com o valor característico de 109 p.p.m. para o anel do *O*-isopropilideno de 5 membros - (43, 44). Estes resultados são sensíveis as variações de pH, sendo os valores de δ_c 109,07 e 108,92, respectivamente, para os sais de bário. Como seria esperado, estes sinais estão em campo mais baixo do que o sinal do carbono não protonado do acetal cíclico de 6 membros do dimetil acetal do 3,6-anidro-4-*O*-[4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosil]-*L*-galactose 9 (58), que tem δ_c 100,46 (ácido livre) e δ_c 101,87 (sal de bário). A dependência do pH é observada com as ressonâncias dos CH₃ dos acetais dos metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeos 6 e 5 que, à temperatura ambiente, se deslocaram de δ_c 23,93 e 24,06 (ácido livre) para um campo mais baixo com δ_c 24,55 e 24,58 (sal de bário), respectivamente.

Os deslocamentos químicos dos grupos CH₃ podem ser usados para caracterizar o tamanho do anel do acetal em polissacarídeos. Assim o sal de bário da galactana contendo acetal de ácido pirúvico da glândula de albúmen de *P. lineata* (31) dá um sinal do CH₃ de δ_c 24,6, (temperatura de 33°) es-

tando de acordo com os valores de δ_c 24,6-25,2, descrito para polissacarídeos de bactérias, que contêm grupos (1-carboxietilideno) de 5 membros (44). Estes valores diferem daqueles obtidos com os diastereoisômeros de 6 membros do metil 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo, que apresentam δ_c 17,2 e 26,1. Vale ressaltar que o valor de δ_c 26,44 foi obtido para o metil 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- α - β -*D*-galactose (sal de bário; 10) e de δ_c 27,1 para os polissacarídeos correspondentes desta série. Também um valor de δ_c 26,26 foi assinalado para o sal de bário do dimetil acetal 3,6-anidro-4-*O*-[4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosil]-*L*-galactose 9. Estes valores são semelhantes aos encontrados em outros polissacarídeos (43, 44). A pequena diferença de 0,03 p.p.m. entre as ressonâncias dos CH₃ diastereoisômeros do sal de bário do metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo é insuficiente para estabelecer a configuração do acetal de ácido pirúvico na galactana de *P. lineata* já mencionada. Ao contrário, o sinal do C-3 é configuracionalmente dependente, apresentando δ_c 81,12 como no composto 6 e 80,44, no 5. Como o sinal de C-3 dessa galactana é de δ_c 81,9, a configuração do anel acetálico é favorável àquela do composto 6. Esta conclusão é confirmada, usando-se a espectroscopia de ressonância nuclear magnética de próton (¹H-n.m.r.).

O composto 6 (sal de bário) em D₂O a 70° dá um sinal do CH₃ de δ 1,97, enquanto o do diastereoisômero 5 é de δ 2,07. O grupo *O*-(1-carboxietilideno) na galactana dá um sinal do CH₃ de δ 1,99, correspondendo à configuração do compos

to 6, a qual é oposta àquelas mencionadas em vários polissacarídeos de bactérias (43), (os valores do deslocamento químico do CH₃ de galactana assim como dos compostos estruturalmente relacionados estão sumarizados na Tabela XIII). Estes sinais estão em campo mais baixo do que δ 1,41, mencionado para o grupo 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo (49) e outros valores de diastereoisômeros dos acetais de 6 membros (43, 44).

Os fatores que afetam a forma do sinal de ressonância no espectro de ¹³C-n.m.r. dos derivados *O*-(1-carboxietilideno) de galactopiranosose e fucopiranosose são:

1. Largura de sinal

O espectro de ¹³C-n.m.r. dos sais de bário dos metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeos 6 e 5, obtidos com o tempo de aquisição convencional, largura do pulso "pulse width" e "sweep width" não apresentaram os sinais correspondentes ao átomo de carbono carbonílico e do carbono não protonado de acetal. Embora esta propriedade tenha surgido, principalmente do alto valor previsto de T₁, um alargamento ocorreu nos sinais dos espectros dos átomos de carbono não protonados dos acetais de certos compostos. Por exemplo, o metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo 6 (sal de bário), que deu um espectro mostrando um sinal do C-2'

de δ_c 109,6, com uma maior largura de sinal (medida a meia altura) igual a 2,5 Hz do que aquela do carbono mono-protonado que é de 1,7 Hz. Geralmente, um átomo de carbono não protonado tem um valor de T_2 maior, e portanto, menores larguras dos picos em relação às aquelas dos átomos de carbono mono-protonado (69). Aumentando-se a temperatura para 70°, cada sinal apresenta de 1 Hz, indicando que o alargamento pode ser devido às pequenas variações conformacionais dos anéis acetálicos, que é lenta na escala de tempo em n.m.r. à temperatura ambiente e rápida a 70°.

A forma ácida do metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo 6 também dá um espectro de ^{13}C -n.m.r., cuja ressonância do carbono não protonado do acetal tem uma maior largura de sinal (2,4 Hz) do que aquelas do átomo de carbono carbonil (0,6 Hz) e o C-1 (1,3 Hz). As respectivas larguras de sinal para a forma ácida do metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-fucopiranosídeo 8 são de 3,9, 1,7 e 1,0 Hz. Um alargamento semelhante ocorre na forma ácida com o sinal do C-2'' (δ_c 107,01, 6,0 Hz) do metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)-2-*O*- β -*D*-galactopiranosil- β -*D*-fucopiranosídeo 11, que era mais largo do que os sinais de C-1 e C-1', δ_c 102,50, 101,90, com uma largura de sinal em ambos de 2,5 Hz.

O alargamento também foi observado com o sinal do C-2' do 4,6-*O*-(1-carboxietilideno)- α - β -*D*-galactose 10 (sal de bário). À temperatura ambiente, a largura de sinal, observada à altura média, foi de 28 Hz (C-2', δ_c 102,06) e 2,0 Hz

(C-1, δ_c 97,20), enquanto que a 70° eles foram de 16 e 2 Hz, respectivamente. No entanto, nestes espectros, o sinal do C-2' origina-se dos isômeros de α e β , levando, assim, a estimativa da largura de sinal, que também era possivelmente alta. O já mencionado fenômeno da largura do sinal não ocorre com outros derivados *O*-(1-carboxietilideno) tais como, metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo 5 (sal de bário) e as formas de sal de bário e ácido livre do dimetil acetal 3,6-anidro-4-*O*-[4,6-*O*-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosil]-*L*-galactose 9.

2. Valores de T_1

Estes valores foram medidos pelo método da inversão recuperada, modificada por Freeman-Hill (41), e, como esperado, os valores obtidos para o sal de bário do metil 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- β -*D*-galactopiranosídeo 6, foram muito variados, dependendo do átomo de carbono, sendo 11 s e 10 s para o carbono carboxílico e o carbono não protonado do acetal, respectivamente, e, 0,44-0,72 s para outros átomos de carbono com exceção dos átomos de carbono do -OCH₃. Embora os valores de T_1 não tenham sido obtidos a 70° para este composto, um valor de T_1 comparável de 23 s, para os átomos de carbono não protonado, foi obtido com o metil 3,4-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo. Outros valores de T_1 foram obtidos para vários acetais (Tabela XIV).

O aumento do peso molecular leva ao aumento dos tempos de correlação e valores baixos de T_1 . Isto ocorre, partindo-se do metil 3,4-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo, cujos átomos de C-2' tem valores de C-1 de 10,8 e 0,82 s, respectivamente, para o metil 6-*O*- β -*D*-galactopiranosil-3,4-*O*-isopropilideno- β -*D*-galactopiranosídeo, cujos valores correspondentes são 5,7 e 0,47s. Os valores de T_1 dos grupos metil dos acetais diminuem de 0,91-0,68 s para 0,66 e 0,51 s. No caso do espectro de carbono-13 da galactana contendo acetal de ácido pirúvico (31), obtido a 70°, o sinal do carbono carbonílico não aparece, e o sinal do carbono não protonado do acetal com δ_c 109,0 é menor em comparação com o sinal do CH₃ do acetal com δ_c 25,3 e com o sinal do C-3 de uma unidade de β -*D*-galactopiranosil contendo acetal de ácido pirúvico com δ_c 81,9 (Fig. 7, A).

Assim parece que a diminuição do sinal do carbono não protonado (C-2") é devida a um valor de T_1 comparativamente muito alto.

3. Valores do efeito nuclear do "Overhauser"

Normalmente com moléculas pequenas, o aumento na intensidade de um sinal de ressonância de C-13 como um resultado do desacoplamento do próton (70) o valor do efeito nu-

clear de "Overhauser" se aproxima do máxima de 2,988 (2,70). Para se obter o valor máximo, o relaxamento do ^{13}C pode ocorrer inteiramente por interações dipolo-dipolo do $^{13}\text{C-H}$, e o tempo de correlação efetiva para reorientação rotacional deve estar numa faixa baixa, típico de moléculas pequenas (70). Os valores de n.O.e. para átomos de carbono de colesteril e sacarose são ~ 3 , mas valores menores foram obtidos para o C-4 e C-5 da adenosina, 5' -monofosfato, indicando que mecanismos de relaxação, além das interações dipolo-dipolo, são importantes (70). Isto parece ser um fator de contribuição para diminuir a intensidade do sinal carbonil do C-1' do sal de bário do metil 3,4-O-(1-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosídeo 6. Os valores de n.O.e. foram determinados por comparação da integral do sinal com o ruído obtido num espectro convencional, de um obtido pela técnica "anti-gated" (1, 42). O átomo C-1' tem um valor de n.O.e. de 1,4, menor do que 2,3-3,1, observado para outros átomos de carbono. No caso do metil 3,4-O-(1-carboxietilideno)- β -D-fucopiranosídeo 8 (sal de bário), o n.O.e. foi maior para o C-1', sendo 2,4 (comparado com 2,5-3,0 para outros átomos de carbono). Assim, valores baixos de n.O.e. podem contribuir para sinais menores do carbonil em C-1, que é o carbono mais afastado de prótons, mas têm um efeito pequeno no tamanho do sinal do carbono não protonado ao acetal (C-2"), que se assemelha a outros átomos de carbono não protonados e cujo n.O.e. é ~ 3 (71) (Tabela XV).

Os espectros de ressonância nuclear magnética de carbono-13 das formas ácidas do metil 3,4-O-(1-carboxietilide

no)- β -D-galactopiranosídeo 6 e o metil 3,4-O-(1-carboxietilideno)- β -D-fucopiranosídeo 8 também mostraram sinais de ressonância do carbono carbonílico, apesar dos valores baixos do n.o.e. de 1,3 e 1,5, respectivamente (Tabela XV).

A β -D-galactopirananana de glândula de albúmem de *P. lineata* contém grupo 3,4-O-(1-carboxietilino) como demonstrado pela liberação de ácido pirúvico da hidrólise ácida do polímero.

Pelos dados de metilação (presença de 2,6-di-O-metil-D-galactopiranosose) foi possível estabelecer o posicionamento do acetal de ácido pirúvico na galactana de *P. lineata*, como envolvendo O-3 e O-4 de suas unidades terminais não redutoras.

A configuração do acetal de ácido pirúvico foi estabelecida por comparar os dados de espectroscopia de n.m.r. (^{13}C e ^1H) da galactana *P. lineata* com aqueles obtidos de compostos sintéticos, usados como modelos. Baseado no deslocamento químico do sinal do carbono não protonado do acetal (δ_{C} 109,0) foi possível estabelecer o tamanho do anel de acetal como sendo de cinco membros, ao contrário de um anel de seis membros cujo sinal do carbono não protonado encontra-se em campo mais alto (δ_{C} 100,5 - 102,4). O sinal com δ_{C} 81,9 é típico de C-3 de unidades de β -D-galactopiranosil substituído por grupo acetal, assim como o sinal com δ_{C} 25,3 é caracte

rístico do grupo CH_3 do acetal. Estes dados em conjunção com aqueles obtidos por ^1H -n.m.r. (CH_3 , δ 1,99 a 70° , semelhante ao do composto 6), indicam a configuração endo-carboxílica para os grupos 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)- da galactana de *P. lineata*. Esta configuração difere daquela verificada para os acetais de ácido pirúvico relatada nos polímeros de bactérias (44) que apresentam configuração exo-carboxílica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, G.A. & BISHOP, C.T. Constitution of an arabinogalactan from Maple sap. *Can. J. Chem.* 38:2380-2386, 1960.
2. ALLERHAND, A., DODDRELL, D. & KOMOROSKI, R. Nature abundance carbon-13 partially relaxed Fourier-transform nuclear magnetic resonance spectra of complex molecules. *J. Chem. Phys.*, 55:139-198, 1971.
3. AMARAL, D., KELLY, F.F. & HORECKER, B.L. Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. *Meth. Enzymol.*, 9:87-92, 1966.
4. ANDERSON, D.M.W. & CREE, G.M. Studies on uronic acid materials. *Carbohydr. Res.*, 5:385-403, 1968.
5. ANDERSON, S.A., GREENWOOD, C.T. & HIRST, E.L. Physicochemical studies on starches. Part. II - The oxidation of starches by potassium metaperiodate. *J. Chem. Soc.*, :225-231, 1955.
6. ANTONOPOULOS, C.A. A modification for the determination of sulphates in mucopolysaccharides by the benzidine method. *Acta Chem. Scand.*, 16:1521-1522, 1962.
7. ASLANI-SHOTORBANI, C., BUCHANAN, J.C., EDGAR, A.R., HENDERSON, D. & SHAHIDI, P. Application of ^{13}C -n.m.r.

in a reexamination of the isopropylidene of
D-ribose diethyldithio acetal and erythritol.

Tetrahedron Letters, 21:1791-1792, 1980.

8. ASPINAL, G.O. & WHITEHEAD, C.C. Mesquite gum. I. The 4-*O*-methyl-glucuronogalactan core. *Can. J. Chem.* 48:3840-3849, 1970.
9. BAKER, S.A. & SOMERS, P.J. A espectrophotometric method for the determination of formic acid on the periodate oxidation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 3:220-231, 1955.
10. BALDWIN, E. & BELL, D.J. A preliminary investigation of galactogen from the albumen glands of *Helix pomatia*. *J. Chem. Soc.* :1461-1465, 1938.
11. BARRY, V.C. Regulated degradation of 1,3 polysaccharides. *Nature*, 152:537-538, 1943.
12. BEBAULT, G.M., DUTTON, G.G.S., FUNELL, N.A. & MACKIE, K. L. Structural investigation of *Klebsiella* serotipo K 32. *Carbohydr. Res.*, 63:183-192, 1978.
13. BELL, D.J. & BALDWIN, E. The chemistry of galactogen from *Helix pomatia*. *L*-galactose as a component of a polysaccharide of animal origin. *J. Chem. Soc.*:125-132, 1941.
14. BELL, D.J. A determination of the relationship between refractive index and specific rotation in mixtures of

- 3:3:4:6-tetramethyl δ -and β -methyl-*D*-galactosides.
J. Chem. Soc. :1543-45, 1940.
15. BOAS, N.F. Method for the determination of hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.*, :204:553-563, 1953.
16. BOREN, H.B., EKLIND, K., GAREGG, P.J., LINDBERG, B. & PILOTTI, A. Synthesis of 6-deoxy-*D*-mannoheptose. *Acta Chem, Scand.*, 26:4143-4146, 1972.
17. BORGES, E.A. Estudo estrutural sobre galactano isolado da glândula de albúmen de *Ampullarius* sp (Sto. Antonio da Platina, Paraná). Tese de Mestrado apresentada e defendida no Departamento de Bioquímica da U.F.P.R., 1977.
18. BOUVENG, H. & LINDBERG, B. Hydrolysis of methylated polysaccharides. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5:296-297, 1965.
19. BJÖRNDAL, H., ERBING, C., LINDBERG, B, FAHRAEUS, G. & LJUNGGREN, H. Studies on an extra-cellular polysaccharide from *Rhizobium meliloti*. *Acta. Chem. Scand.*, 25:1281-1286, 1971.
20. BJÖRNDAL, H., HELLERQVIST, C.G., LINDBERG, B. & SVENSSON, S. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides, *Angew. Chem. Internat. Edit. Engl.*, 9:610-619, 1970.
21. BLOCK, J.R., DURRUM, E.L. & ZWEIG, G. A manual of paper

- chromatography and paper electrophoresis. 2 ed.
Academic Press, New York, 1958, p 99, 232-240.
22. BRETTING, H., WHITTAKER, N.F., KABAT, E.A., KONIGSMANN-LANGE, K. & THIEM, H.J. Chemical and immunochemical studies on the structure of four snail galactans. *Carbohydr. Res.*, 98:213-236, 1981.
23. BRUNETTI, P., SWANSON, A. & ROSEMAN, S. Enzymatic determination of sialic acids. *Meth. Enzymol.*, 6:465-473, 1957.
24. BUCHANAN, J.C., CHACON-FUERTES, M.E., EDGAR, A.R., MOORHOUSE, S.J., RAWSON, D.I. & WIGHTMAN, R.H. Assignment of ring size in isopropylidene acetals by carbon-13 n.m.r. *Tetrahedron Letters*, 21:1793-1796, 1980.
25. CADMUS, M.C., ROGOVIN, S.P., BURTON, K.A., PITTSLEY, J.E., KNUTSON, C.A. & ALLENE, J. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can. J. Microbiol.*, 22:942-943, 1976.
26. CHAUDHARI, A.S., BISHOP, C.T. & DUDMAN, W.F. Structural studies on the specific capsular polysaccharide from *Rhizobium trifolii*, T A-1. *Carbohydr. Res.*, 28:221-231, 1973.
27. CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. & WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 28:1756-1758, 1956.

28. CORRÊA, J.B., DMYTRACZENKO, A. & DUARTE, J.H. Structure of a galactogen found in the albumen glands of *Biomphalaria glabrata*. *Carbohydr. Res.*, 3:445-452, 1967.
29. DIAZ-SEGURA, E.A. & DUARTE, J.H. Methylation studies of the polysaccharides resulting from sequential Smith degradations of the galactan from the snail *Strophocheilus oblongus*. *Carbohydr. Res.*, 52:159-167, 1976.
30. DUARTE, H.S. Alguns aspectos estruturais do polissacárido da glândula de albúmen de *Ampullarius* sp (Recife, PE). Tese de Mestrado apresentada e defendida no Departamento de Bioquímica da U.F.PR., 1976, 30 p.
31. DUARTE, H.S., DUARTE, G.R., DUARTE, M.E.R., IACOMINI, M. & DUARTE, J.H. Alguns aspectos estruturais de galactanas de glândula de albúmen de *Ampullarius* sp e *Marisa cornuarietis*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 23(2):135, 1980.
32. DUARTE, J.H. & JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail *Strophocheilus oblongus*. *Carbohydr. Res.*, 16:327-334, 1971.
33. DIEOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., ROBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-352, 1952.

34. DUCKWORTH, M. & YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 16:189-197, 1970.
35. DUCKWORTH, M. & YAPHE, W. Defenitive assay for pyruvic acid in agar other algal polysaccharides. *Chem. Industry*, 6:747-748, 1970.
36. DUDMAN, W.F. & HEIDELBERGER, M. Immunochemistry of newly found substituents of polysaccharides of *Rhizobium* species. *Science*, 194:954-955, 1969.
37. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Eletrophoresis of dried polysaccharides on cellulose acetate. *Can. J. Chem.*, 46:3079-3084, 1968.
38. ERBING, C., KENNE, L., LINDBERG, B., LÖNNGREN, J. & SUTHERLAND, I.W. Strutural studies on the capsular polysaccharides from *Klebsiella* type I. *Carbohydr. Res.*, 50:115-120, 1976.
39. FEIJÕ, M.A.L. & DUARTE, J.H. Some structural studies on the fucogalactan from egg masses of the snail *Ampullarius* sp. *Carbohydr. Res.*, 44:241-249, 1975.
40. FEIJÕ, M.A.L. Estudo sobre a estrutura e biodegradação dos polissacarídeos componentes da massa de ovas de moluscos *Ampullarius* sp (Pelotas, R.G.). Tese de Doutorado apresentada e defendida no Departamento de Bioquímica da U.F.P.R., 1982, 66 p.

41. FREEMAN, R. & HILL, H.D.W. High resolution studies of nuclear spin lattice relaxation. *J. Chem. Phys.*, 51: 3140-3141, 1969.
42. FREEMAN, R., HILL, H.D.M. & KAPILIN Proton decoupled n.m.r. spectra of carbon-13 with the nuclear Overhauser effect suppressed. *J. Magn. Reson.*, 7:327-329, 1972.
43. GAREGG, P.J., LINDBERG, B. & KVARNSTROM, I. Preparation and n.m.r. studies of pyruvic acid and related acetals of pyranosides: Configuration at the acetal carbon atoms. *Carbohydr. Res.*, 77:71-73, 1979.
44. GAREGG, P.J., JANSSON, P.E., LINDBERG, B., LINDH, F., LÖNNGREN, J., KVARNSTROM, I. & NIMMICH, W. Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 78:127-132, 1980.
45. GOLDSTEIN, I.J., HAY, G.W., LEWIS, B.A. & SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5:361-370, 1965.
46. GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.T. Isolation of 4,6-O-(1-carboxiethylidene)-D-galactose from the exocellular polysaccharide of *Corynebacterium insidiosum*. *Can. J. Chem.*, 42:1230-1232, 1964.

47. GORIN, P.A.J. & ISHIKAWA, T. Configuration of pyruvic acid ketals, 4,6-*O*-linked to *D*-galactose units, in bacterial and algal polysaccharides. *Can. J. Chem.*, 45:521-532, 1967.
48. GORIN, P.A.J., ISHIKAWA, T., SPENCER, J.T. & SLONEKER, J.H. Configuration of the pyruvic acid ketals, 4,6-*O*-linked to *D*-glucose units, in *Xanthomonas campestris* polysaccharide. *Can. J. Chem.* 45:2005-2008, 1967.
49. GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.T. Structure of the extracellular polysaccharides from *Corynebacterium insidiosum*. *Carbohydr. Res.*, 79:313-315, 1980.
50. GUIMARÃES, M.F., RIGO, L. & VEIGA, L.A. Metabolism of 6-deoxyhexoses in *Pullularia pullulans*. *Biochemistry and Genetics of Yeasts*, Ed. Stoppani, M. Bacila and M. L. Horecker. Academic Press, New York, 1978, p.161-170.
51. HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbonion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, (Tokyo), 55:205-208, 1964.
52. HAMMARSTEN, O. Studien über mucin und mucinähnliche substanzen. *Pfluger, Arch. Physiol.*, 36:373-455, 1885.
53. HARADA, T., ANEMURA, A., JANSSON. P.E. & LINDBERG, B.

Comparative studies of polysaccharides elaborated by *Rhizobium alcaligenes*, and *Agrobacterium*. *Carbohydr. Res.*, 77:285-288, 1979.

54. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. *J. Chem. Soc.*, 107:8-16, 1915.
55. HAY, G.W., LEWIS, B.A. & SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: General procedures. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5:357-361, 1965.
56. HEIDELBERGER, M., DUDMAN, W.F. & NIMMICH, W. Immunochemical relationships of certain capsular polysaccharides of *Klebsiella*, *Pneumococcus*, and *Rhizobium*. *J. Immunology.*, 104:1321-1328, 1970.
57. HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar XIX. Pyruvic acid as a constituent of agar-agar. (Part 2). Isolation of the pyruvic acid-linking disaccharide derivative isolated from the methanolysis products of agar. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 30:70-75, 1957.
58. HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar XIX. Pyruvic acid as a constituent of agar-agar. (Part 3). Structure of the pyruvic acid linking disaccharide derivative isolated from the methanolysis products of agar. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 30:75-79, 1975.

59. HISAMATSU, M., ABE, J., ANEMURA, A. & HARADA, T.
Structure of the linear repeating unit of succinoglycan accumulated in cultures of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. *Agric. Biol. Chem.*, 44:461-462, 1930.
60. HISAMATSU, M., ABE, J., ANEMURA, A. & HARADA, T.
Structure elucidation on succinoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by fragmentation with methylation analysis. *Agric. Biol. Chem.*, 44:1049-1055, 1930.
61. HOFFMAN, J., LINDBERG, B. & SVENSSON, S. Determination of anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta. Chem. Scand.*, 26:661-666, 1972.
62. HONDA, K.N. & DUARTE, J.H. Estudo estrutural dos oligosacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial do galactano isolado de glândula de albúmen de *Megalobulimus paranaguensis*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 21:97-113, 1978.
63. HOUGH, L. & RICHARDSON, A.C. Penta-, hexa- and higher polyhydric alcohols. In: S. Coffey, ROSS'S chemistry of carbon compounds. 2nd Ed., Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1967, V. I Part F, p.19-20.
64. IACOMINI, M., DUARTE, H.S., FEIJÓ, M.A.L., MORETTO, M.I. & DUARTE, J.H. Structural studies on glycerol-glycosides resulting from sequential

- Smith-degradations of the galactan from *Megalobulimus paranaguensis*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 32:83-92, 1980.
65. IACOMINI, M., DUARTE, G.R., DUARTE, M.E.R., DUARTE, H.S., FONTANA, J.D. & DUARTE, J.H. Structural study on snail galactans from the genus *Biomphalaria*. *Agric. Biol. Chem.*, 45:1373-1380, 1981.
66. JANSSON, P.E., KENNE, L. & LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharides from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.*, 45:275-282, 1975.
67. JONES, J.K.N. & WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the methods of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatography. *J. Chem. Soc.*, :1702-1706, 1950.
68. KABAT, E.A. & MAYER, M.M. Kjeldahl nitrogen determination, in Thomas, C. C. (ED.). *Experimental immunochemistry*, Banners tome house, Springfield, Illinois, 1964, p.476.
69. KOMOROSKI, R.A., PEAT, T. & LEVY, G.C. Carbon-13 n.m.r. studies of biopolymers. *Top. Carbon-13 N.M.R. Spectro*, 2:179-267, 1976.
70. KUHMAN, K.F., GRAND, D.M. & HARRIS, R.K. Nuclear overhauser effects and carbon-13 relaxation times in

- ^{13}C -H double resonance spectro. *J. Chem. Phys.*, 52: 3439-3448, 1970.
71. LEONTEIN, K., LINDBERG, B. & L'ONNGRE, N.J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from alcohols. *Carbohydr. Res.*, 62:359-362, 1978.
72. LEVY, G.C., CARGIOLI, J.D. & ANET, F.A.L. Carbon-13 spin-lattice relaxation in benzene and substituted aromatic compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 95:1527-1535, 1973.
73. LEW, J.Y. & HEIDELBERGER, M. Linkage of pyruvyl groups in the specific capsular polysaccharide of *Pneumococcus* type IV. *Carbohydr. Res.*, 52:255-258, 1976.
74. LINDBERG, B. & LUNDSTRON, H. 6-deoxy-6-d-tolylsulphonyl D-glucopyranosides. *Acta. Chem. Scand.*, 20:2423-2426; 1966.
75. LOPES, H.S. Sobre "*Pomacea lineata*" (SPIX, 1827) (Mesogastropoda, Architaenioglossa, Mollusca). *Rev. Brasil. Biol.*, 16:365-370, 1956.
76. LOWRY, O.H., ROSENBROUCH, N.V., FARR, R.V. & RANDALL, R.V. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
77. MADELUNG, W. & OBERWEGNER, M.E. α -Keto-aldehydes. *Chem. Ber.*, 65:931-941, 1932.

78. MAY, F. Beitrag zur Kenntnis des Glykogen und Galaktogengehaltes (*Tierisches Sinistrin*) bei *Helix pomatia*. *Z. F. Biol.*, 92:319-324, 1932.
79. MAY, F. Über den Galaktogengehalt der Eier von *Helix pomatia*. *Z. F. Biol.*, 92:324-330, 1932.
80. MAY, F. Chemical and biological investigation on galactan. *Z. F. Biol.*, 95:277-297, 1934.
81. MORETTO, M.I., IACOMINI, M., FEIJÓ, M.A.L. & DUARTE, J.H. Sequential Smith-degradation on the galactan from the albumen glands of the snail *Megalobulimus paranaguensis*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 22:191-196, 1979.
82. McCOMB, E.A. & McCREADY, C.M. Determination of acetyl in pectin and acetylated carbohydrate polymers. *Anal. Chem.*, 28:819-821, 1957.
83. NEUMÜLLER, G. & VASSEUR, E. The influence of pH. periodate oxidation of carbohydrates. *Arkiv. for Kemi.*, 5:235-245, 1952.
84. O'COLLA; P. The application of the Barry degradation to snail galactogen. *Proc. Roy. Irish. A. Sect. B.*, :165-170, 1953.
85. ORENTAS, D.G., SLONEKER, J.H. & JEANES, A. Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus *Xanthomonas*. *J. Microbiology.*, 9:427-430, 1963.

86. PAINTER, T. & LARSEN, B. Formation of hemiacetals between neighboring hexuronic acid residues during the periodate oxidation of alginate. *Acta. Chem. Scand.*, 24:813-833, 1970.
87. PETIZ, C.A.T. Degradação seqüenciada tipo Smith em galactano de massas de ovas de *Ampullarius* sp (Recife, PE). Tese de Mestrado apresentada e defendida no Departamento de Bioquímica da U.F.PR, 1977, 45 p.
88. REES, D.A. Structure conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 24:267-332, 1969.
89. SANDFORD, P.A. & CONRAD, H.E. The structure of the aerobacter aerogenes A₃ polysaccharide I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. *Biochem.*, 5:1508-1516, 1966.
90. SCHLUBACH, H.H., LOOP, W. & SCHMIDT, H. Constitution of galactogen isolated from the whole bodies of snails. *Annalen*, 525:228-235, 1937.
91. SCHULTZ, T. Determination of the degree of esterification of pectin. Determination of the ester methoxyl content of pectin by saponification and titration. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5:189-191, 1965.
92. SEVENNERHOLM, L. Quantitative estimation of sialic acids. *Biochem. Biophys. Acta.*, 24:604-611, 1957.

93. SIDDIQUI, I.R. A extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.*, 4:284-291, 1967.
94. SLONEKER, J.H. & ORENTAS, D.G. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Part II. Linkage of the pyruvic acid. *Can. J. Chem.*, 40:2183-2189, 1962.
95. SLONEKER, J.H. & ORENTAS, D.G. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. *Nature*, 194:478-479, 1962.
96. SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195:19-23, 1952.
97. STANDFORD, P.A., WATSON, P.R. & KNUTSON, C.A. Separation precipitation with differing pyruvate content by fractional precipitation with alcohol. *Carbohydr. Res.*, 63:253-256, 1978.
98. STAUB, A.M. Removal of proteins. In WISTLER & BEMILLER *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5:5-6, 1965.
99. STEPHEN, A.M., KAPLAN, M., TAYLOR, G.L. & LEISSEGANG, E.C. Application of gas-liquid chromatography to the structural investigation of polysaccharides. *Tetrahedron Supplement.*, 7:223-240, 1966.
100. STODDART, J.F. Stereochemistry of carbohydrates, Willy-Interscience, New York, 1971.

101. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISSON, J.S.
Detection of sugars on paper chromatograms by the use of dipping reagents. *Nature*, 166:444-445, 1950.
102. TULPULE, P.G. & PATWARDHAN, V.N. Application of paper chromatography to the study of the transaminase system. *Nature*, 196:671, 1952.
103. VASKOVSKY, V.E. & ISAY, S.V. Quantitative determination of formaldehyde liberated with periodate oxidation. *Anal. Chem.*, 30:25-31, 1969.
104. VOGEL, A.I. Elementary practical organic chemistry, Part I, Small scale preparation, Section II, 36, Longmans, Green and Co., London, 1957, p.5.
105. WARREN, L. Thiobarbituric assay of sialic acids. *Meth. Enzymol.*, 6:463-465, 1957.
106. WEINLAND, H. Beobachtungen bei der säurehydrolyse des galaktogens II. Mitteil.: Isolierung und nachweis der auftretenden disaccharide 3- β -D-galaktose und 6- β -D-galaktosido-D-galaktose und 6- β -D-galaktosido-D-galaktose mit spuren 6- β -L-galaktosido-D-galaktose. *Z. Physiol. Chem.*, 305:87-96, 1956.
107. WHEAT, R.W., DORSCH, C. & GODOY, G. Occurrence of pyruvic acid in the capsular polysaccharide of *Klebsiella rhinoscleromatis*. *J. Bacteriology*, 89:539, 1965.