

CESAR AUGUSTO TISCHER

**APLICAÇÃO DA RMN NA CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL DE GLICOLIPÍDEOS E POLISSACARÍDEOS
DE *Achatina fulica***

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, pelo Curso
de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Paraná.

Orientadores: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Prof. Dr. Philip Albert James Gorin

CURITIBA
1999

CESAR AUGUSTO TISCHER

**APLICAÇÃO DA RMN NA CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL DE GLICOLIPÍDEOS E POLISSACARÍDEOS
DE *Achatina fulica***

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, pelo Curso
de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Paraná.

Orientadores: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Prof. Dr. Philip Albert James Gorin

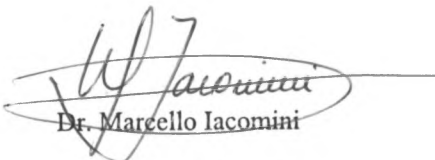
CURITIBA
1999

APLICAÇÃO DA RMN NA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
GLICOLIPÍDEOS E POLISSACARÍDEOS DE *Achatina fulica*

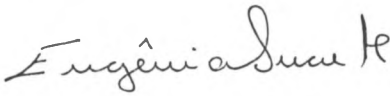
POR

CESAR AUGUSTO TISCHER

Tese apresentada como requisito final à obtenção de grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Banca Examinadora formada pelos professores:



Dr. Marcello Iacomini



Dra Maria Eugênia R. Duarte



Dra Fany Reicher

APLICAÇÃO DA RMN NA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
GLICOLIPÍDEOS E POLISSACARÍDEOS DE *Achatina fulica*

POR

CESAR AUGUSTO TISCHER

Tese apresentada como requisito final à obtenção de grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Dr. Marcello Iacomini

Dr^a Maria Eugênia R. Duarte

Dr^a Fany Reicher

Navegar é **preciso**;

viver ..., não é **exato**.

AGRADECIMENTOS

O fim de uma etapa está concluída e gostaria de agradecer às pessoas que contribuíram cada um a seu modo, e que fazendo parte ou não de seu ofício, deram sua contribuição particular e única no transcorrer deste trabalho.

Agradeço primeiramente ao Prof. Marcello Iacomini, pela orientação e pelo convívio, e por ajudar a reafirmar minha escolha. Ao Prof. Philip A. J. Gorin, que coorientou este trabalho, enriquecendo-o substancialmente.

Aos coordenadores do curso de Pós-Graduação em Bioquímica nestes últimos dois anos, Prof. Marcello, e Prof. Maria Benigna M. Oliveira.

A chefe do Departamento de Bioquímica, Prof. Glaci T. Zancan, pelo suporte proporcionado pelo departamento.

Ao Prof. José H. Duarte pela sua contribuição nos estudos de galactanas de moluscos, entre outros, legado científico que motivou a realização desta tese.

Ao Prof. Miguel D. Nosedá, pela ajuda com o RMN, por seus ensinamentos na química de carboidratos e pela possibilidade de convivência.

Agradeço as colegas de curso da sala 247, Cintia, Sandra, Patrícia, Selene, e Silvia, pelo apoio e amizade.

Agradeço as bibliotecárias da biblioteca do Setor de Ciências Biológicas e aos seus funcionários pela eficiência e disposição.

As amigas Rose, Darlene, a Liliane, ainda a Joaine e Mirian.

Aos colegas de futebol Humberto, Leonardo, e Jean.

Amigos Guilherme e Renato: daqui a cinco minutos eu agradeço.

Às alunas de graduação Luciana e Astrid pela ajuda na extração e purificação da galactana. Às alunas de Iniciação Científica Elaine e Patrícia.

Agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro, e ao PRONEX-Carboidratos por garantir a realização contínua deste projeto.

E por último e principalmente, agradeço a minha família e aos que me cercam, que me proporcionam o pleno viver; com dignidade, justiça, compaixão, e lealdade.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Determinação Estrutural de Carboidratos por RMN	1
2 ESPÉCIE EM ESTUDO: ACHATINA FULICA	2
2.1 Galactanas	5
2.1.1 Biossíntese	12
2.2 Glicolipídeos	14
2.2.1 Glicosfingolipídeos	15
2.2.2 Glicosilglicerolipídeos	17
2.2.3 Caracterização Estrutural de Glicolipídeos	17
3 ESTRATÉGIAS DE DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE GLICOCONJUGADOS POR ESPECTROSCOPIA DE RMN	19
4 OBJETIVOS	24
5 MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 Métodos Gerais	26
5.1.1 Cromatografia em Papel (CP) dos Mono e Oligossacarídeos de Galactana de Glândula de Albúmen	26
5.1.2 Cromatografia Gasosa, Espectrômetria de Massa	27
5.1.3 Derivados Alditóis Acetatos: Redução e Acetilação	27
5.1.4 Metanólise do Glicolipídeo	28
5.2 Processos de Extração, Isolamento e Caracterização	29
5.2.1 Obtenção do Glicolipídio a partir da fração A1Af de	

Glândula de Albúmen de <i>A. fulica</i>	29
5.2.2 Isolamento da Galactana de Glândula de Albúmen de <i>A. fulica</i>	30
5.2.3 Hidrólise Total da Galactana	31
5.2.4 Produção dos Oligossacarídeos por Hidrólise parcial da Galactana	31
5.2.5 Degradações Sequenciadas da Galactana de Glândula de Albúmen de <i>A. fulica</i>	32
5.2.6 Espectrometria de Massa de Spray Eletrônico (ESI-MS) dos Oligossacarídeos de Hidrólise Ácida Parcial de Galactana	33
5.3 Métodos Espectroscópicos: RMN	33
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1 Galactanas de <i>A. fulica</i>	39
6.2 Glicolípido isolado da glândula de albúmen do molusco <i>A. fulica</i>	62
7 CONCLUSÕES	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE TABELAS

1: COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS ANALÍTICAS DA QUÍMICA DE CARBOIDRATOS	19
2: RESPOSTAS DOS ESPECTROS UNIDIMENSIONAIS	20
3: ALGUNS DOS PRINCIPAIS EXPERIMENTOS BIDIMENSIONAIS E INFORMAÇÕES NA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE CARBOIDRATOS	22
4: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS OBTIDOS A PARTIR DOS ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C DO OLIGOSSACARÍDEO P85-A, DE HIDRÓLISE PARCIAL DA GALACTANA DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE <i>A. fulica</i>	50
5: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS OBTIDOS A PARTIR DOS ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C DO OLIGOSSACARÍDEO P85-B, DE HIDRÓLISE PARCIAL DA GALACTANA DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE <i>A. fulica</i>	54
6: ASSINALAMENTO PARCIAL DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DA GALACTANA DE GLANDULA DE ALBÚMEN DE <i>A. fulica</i>	61
7: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H E ^{13}C PARA O MONOGLUCOSIGLICERÍDEO ISOLADO DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE <i>A. fulica</i>	63
8: COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDAS A PARTIR DOS SEUS ÉSTERES METÍLICOS	63

LISTA DE FIGURAS

1 ESPÉCIME DE <i>A. fulica</i>	2
2 LOCALIZAÇÃO DA GLÂNDULA DE ALBÚMEN NO INTERIOR DO CARACOL	5
3 ESPECTRO DE ¹³ C-RMN DO POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE <i>M. paranaguesis</i> , A FREQUÊNCIA DE 25MHZ EM D ₂ O, A A TEMPERATURA DE 70°C	11
4: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES DE GLICOLÍPÍDEO E POLISSACARÍDEOS	38
5 ESPECTROS DE ¹ H-RMN DE (A) DA FRAÇÃO BA, MATERIAL INSOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO-METANOL, (B) DO MATERIAL H2ODIAL, CORRESPONDENDO AOS COMPOSTOS DE BAIXO PESO MOLECULAR QUE PASSARAM PELOS POROS DO SACO DE DIÁLISE, (C) DE B1S2P3, MATERIAL ANTES DA PURIFICAÇÃO COM CETAVLON, (D) DO PRECIPITADO EM PH8,5, DENOMINADO P85	40
6 ESPECTROS DE ¹³ C-RMN DOS MATERIAIS (A) DA FRAÇÃO BA, MATERIAL INSOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO-METANOL, (B) MATERIAL H2ODIAL, CORRESPONDENDO AOS COMPOSTOS DE BAIXO PESO MOLECULAR QUE PASSARAM PELOS POROS DO SACO DE DIÁLISE, (C) DE B1S2P3, MATERIAL ANTES DA PURIFICAÇÃO COM CETAVLON, (D) DO PRECIPITADO EM PH8,5, DENOMINADO P85	42
7 ESPECTRO DE ¹³ C-RMN DE <i>M. paranaguesis</i>	43
8 ESPECTRO DE ¹³ C-RMN DA GALACTANA DE <i>A. fulica</i>	44
9 ESPECTRO DE HMQC DO POLISSACARÍDEO ISOLADO DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE (A) <i>M. paranaguesis</i> , E (B) <i>A. fulica</i>	45
10 CP ANALÍTICA DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA GALACTANA DA	

GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE <i>A. fulica</i>	47
11 ESPECTRO DE HMQC DO OLIGO P85-A DA HIDRÓLISE PARCIAL DA GALACTANA DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE <i>A. fulica</i>	49
12 ESPECTRO DE ¹ H-RMN E SECÇÕES MONODIMENSIONAIS DOS ESPECTROS DE 2D	52
13 OLIGOSSACARÍDEO P85-A AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE ¹ H-RMN; ¹³ C-RMN AMPLIADO NA REGIÃO DE C1 A C6	53
14 ESPECTROS DE ¹³ C-RMN DAS FRAÇÕES DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDAS A PARTIR DO HIDROLISADO ÁCIDO DA GALACTANA DAS GLÂNDULAS DE ALBÚMEN DE <i>A. fulica</i>	56
15 SIMULAÇÃO DO ESPECTRO DE ¹³ C-RMN DO MODELO PROPOSTO POR O'COLLA, REPRESENTADO PELA ESTRUTURA 5	58
16 REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE ¹ H-RMN DOS POLISSACA- RÍDEOS RESULTANTES DE DEGRADAÇÕES SEQUENCIADAS DE SMITH COM AS SUAS RELAÇÕES DE ÁREA RELATIVAS, ONDE (A) É O MATERIAL APÓS A 1ª DEGRADAÇÃO, (B) DA 2ª E (C) DA 3ª DEGRADAÇÃO	60
17 ESPECTROS DE ¹³ C-RMN DA REGIÃO ANOMÉRICA DE (A) POLISSACARÍDEO ORIGINAL, (B) MATERIAL RESULTANTE DA TERCEIRA DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH	62
18 ESPECTRO DE HMQC DO GLICOLIPÍDIO A1, DE GLÂNDULA DE ALBUMEN DE <i>A. fulica</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ (PPM): deslocamento químico

θ_z : ângulo de transferência de polarização

^{13}C -DEPT: acrônimo de "Distortionless Enhancement by Polarization Transfer"

^{13}C -RMN: técnica de RMN utilizando o isótopo 13 do carbono

^1H -RMN: técnica de RMN utilizando o isótopo 1 do hidrogênio

^{31}P -RMN: técnica de RMN utilizando o isótopo 31 de fósforo

J : constante de acoplamento

$^1J_{\text{H,C}}$: constante de acoplamento entre hidrogênio e carbono através de uma ligação

3J : constante de acoplamento através de três ligações covalentes

CCD: cromatografia em camada delgada

CG-EM: cromatografo gasoso acoplada a espectrometro de massa

CHCl_3 : clorofórmio

COSY: acrônimo de "Correlation Spectroscopy"

CP: cromatografia em papel

FAB-MS: espectrometria de massa por combardeamento com átomos acelerados

D_2O : óxido de deutério

ESI-MS: espectrômetro de massa com ionização por spray eletrônico

EtOH: etanol absoluto

Gal: unidade de galactose

Galp: unidade de galactopiranosose

GLC: cromatografia gás-líquido

Gly: glicerol

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HMQC: acrônimo de "Heteronuclear Multiple Quantum Correlation spectroscopy"

INEPT: acrônimo de "Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer"

MALDI-TOF: "Matrix-Assisted Laser Desorbtiom Ionization/Time-Of-Flight", ou, espectrometria de massa com ionização por dessorção por laser em matriz assistida em tempo de voo.

MeOH: metanol

R_{gal}: fator de retenção relativo a galactopiranosose

RMN: ressonância magnética nuclear

ROESY: acrônimo de "Rotating frame Overhauser effect Spectroscopy"

TFA: ácido trifluoroacético

TOCSY: acrônimo de "Total Correlation Spectroscopy"

v/v: volume por volume

γ: constante giromagnética

RESUMO

Glândulas de albúmen do molusco comestível *Achatina fulica* foram submetidas a processos de extração a fim de se obter glicolipídeos e polissacarídeos. Os deslocamentos químicos destas estruturas foram determinados. Assim foi caracterizado um polissacarídeo que demonstrou ser uma galactan. Na análise deste métodos químicos foram empregados, como: produção por hidrólise ácida parcial e purificação de oligossacarídeos, e degradações sequenciadas de Smith.

O glicolipídeo isolado, através da interpretação dos dados de RMN demonstrou ser o composto $O\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\leftrightarrow\text{1)-D-glicerol}$, e que os principais ácidos graxos presentes são ác. palmítico e aracdônico.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Determinação Estrutural de Carboidratos por RMN

Os carboidratos são altamente dispersos na natureza, atuando como constituinte estrutural (celulose) ou na parede celular de bactérias, como fonte de reserva de energia como o glicogênio e amido, ou ainda como agente imunogênico (nas bactérias), e de reconhecimento celular (Aspinall 1982). Estas moléculas podem estar ainda ligadas a proteínas ou lipídeos, na forma de glicoproteínas e glicolipídeos respectivamente. Assim, a gama de funções se multiplica gerando sítios ativos de enzimas, a identidade dos grupos sanguíneos, lubrificantes (mucinas do trato gastrointestinal), agentes anti-congelantes (nos peixes árticos) (Bernstein e Hall, 1983), e muitas outras funções conhecidas, e, a serem reveladas.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma importante ferramenta na pesquisa biológica, e hoje, a maioria dos pesquisadores que utilizam RMN o fazem na elucidação de estruturas ou no estudo de mecanismos biológicos (Wagner, 1997).

A determinação estrutural de óligo- e polissacarídeos é usualmente realizada por RMN (Agrawal, 1992; van Halbeek, 1994), pois é útil na determinação da configuração glicosídica, posição das ligações, seqüência de ligação, e da conformação espacial de oligossacarídeos ou partes específicas de carboidratos complexos (Evans, 1996).

2 ESPÉCIE EM ESTUDO: *ACHATINA FULICA*

O molusco terrestre *Achatina fulica* Ferussac 1821, conhecido como “Caracol Gigante Africano”, pertence a família Achatinidae. Originalmente nativo do leste Africano, hoje está espalhado por diversos países, principalmente devido ao seu rápido ciclo reprodutivo. Por este fator, aliado ao seu apetite voraz, faz com que seja considerado por muitas autoridades como praga, com o maior poder de destruição dentre os caracóis terrestres (Roessler *et al*, 1977).

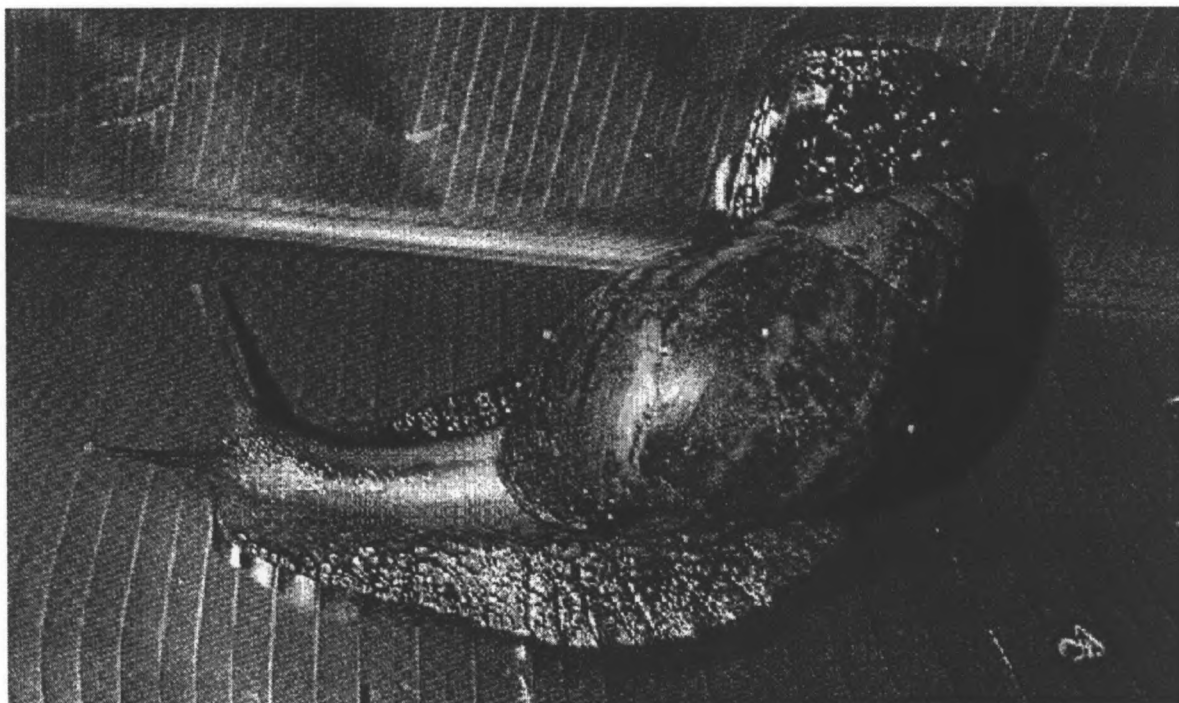


FIGURA 1: ESPÉCIME DE *Achatina fulica*

Este caracol possui um grande apetite, alimentando-se de mais de 500 plantas diferentes, com preferência por fruta-pão, cacau, mamão, e muitas espécies de legumes e pepinos.

O *A. fulica* pode ser vetor de uma doença humana conhecida como meningite eosinófila, causada por um parasita de ratos, o *Angiostrongylus cantonensis*. O parasita atinge o ser humano por ingestão do molusco cru ou mal preparado (Teles *et al.*, 1997). Diversas espécies de caracóis foram usados como agentes de controle biológico na tentativa de controlar infestações de *A. fulica*. Das cerca de 70 espécies de predadores naturais apenas três alcançaram êxito duas de *Gonaxis* sp. e *Euglandina rosea*.

O caracóis são hermafroditas incompletos, isto é, embora possuam os dois sexos, não autofecundam e precisam de um parceiro para se reproduzir. Sua atividade sexual é intensa ao atingir a maturidade, que se inicia a partir do sétimo mês de vida.

A postura das ovas dar-se-á entre 15 a 30 dias após o acasalamento, em lugar fresco, úmido mas não encharcado e construindo seu ninho cavando com a parte anterior do pé, um buraco de 3 a 5 cm de profundidade, mais largo no fundo, parecido com um cogumelo. O caracol enterra sua parte anterior o mais profundo possível e aí permanece de mais ou menos 20 horas, dependendo do número de ovas produzidas. As condições de terreno necessárias para o local da postura se encontra nas beiradas de bosques/matras, contendo matéria orgânica, úmido sem ser encharcado.

O *A. fulica* é um caracol tropical, mas pode sobreviver a condições de frio. Depois de uma cópula pode produzir um grande números de posturas de ovas

(cerca de 100 a 400) durante meses chegando a 1200 em um ano. As ovas são esféricas ou elipsoidais, com 4,5-5,5 mm de diâmetro e tem a cor de amarelada a creme, semelhantes a um ovo de galinha. A eclosão se dá com 8-21 dias em clima tropical (a mais ou menos 20°C e umidade de 85%). Eles rompem a casca do ovo e dela se alimentam permanecendo no ninho de 5 a 10 dias. Depois disso saem por orifícios feitos por eles próprios. Ao nascer, o filhote é translúcido, com 3 a 4 mm de diâmetro e já tem uma concha bastante fina que vai se calcificando aos poucos. Eles variam de peso e tamanho numa mesma ninhada mais ou menos 2 a 5 gramas, e, ao sair do ninho já procuram comida.

O *A. fulica* é bastante característico quanto a sua forma e cor, quando comparado a outros moluscos, e facilmente identificável pela concha longa e cônica. Quando adulto a concha pode chegar a 20 cm porém o mais comum está entre 5 a 10 cm. Sua cor pode variar mas geralmente é um marrom brilhante interrompido por bandas de cor creme nos espécimes jovens. Vive cerca de seis a nove anos, contudo, pode entrar em hibernação e permanecer anos neste estado. A relação entre um número de moluscos ativos e em hibernação num ambiente em condições ótimas para atividade, pode ser usado como controle ambiental.

Já foram diagnosticadas algumas doenças nestes animais, as principais causas:

- fungos: Doença da postura rosa - doença parasitária provocada pelo microfungo do gênero *Fusarium* que parasita as ovas do escargot, adquirindo cor rosada ou marrom.
- bactéria: a *Pseudomona aeruginosa* causa a Pseudomonose, doença que causa infecção intestinal.

- ácaros: foram encontrados em escargots e lesmas.

2.1.1 Galactanas

O mais conhecido polissacarídeo de caracóis são as galactanas. São polissacarídeos altamente ramificados de massa molecular elevada que são sintetizadas, entre outros, pela glândula de albúmen de caracóis pulmonados e prosobranchiados de diferentes famílias de moluscos da classe Gastrópoda, e secretado junto ao fluido perivitelínico, no qual as ovas estão aderidas. É o único polissacarídeo de reserva para o desenvolvimento embrionário e para os caracóis recém eclodidos (Goudsmit, em Florkin e Scheer 1972).

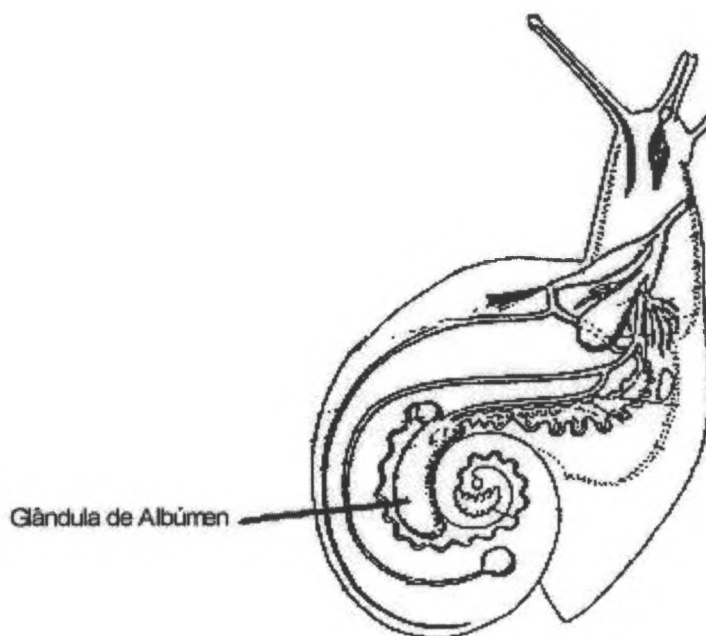
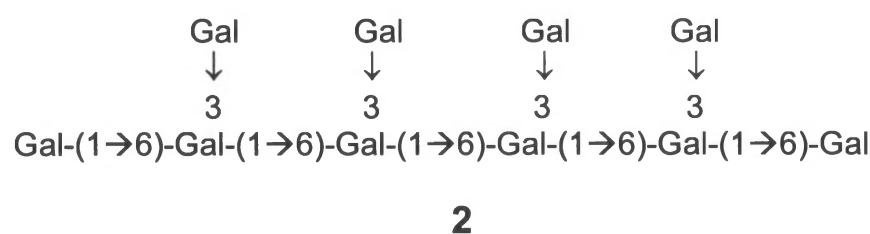
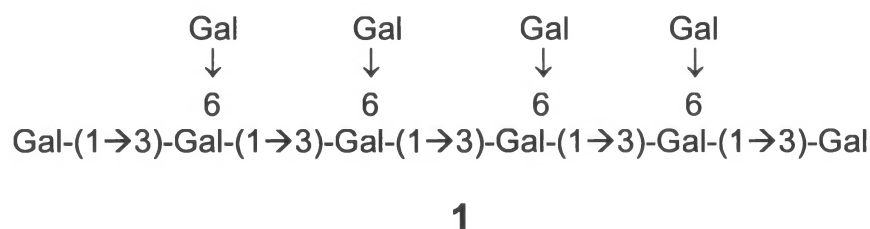


FIGURA 2: LOCALIZAÇÃO DA GLÂNDULA DE ALBÚMEN NO INTERIOR DO CARACOL

As galactanas são encontradas em várias espécies de moluscos compostas geralmente de β -D-, ou β -D- e β -L-galactopiranosose. Muitas variações estruturais ocorrem, dependendo da espécie, porém geralmente são compostas quase que exclusivamente de D-galactopiranosose. No caso de heteropolissacarídeos, constituem um núcleo altamente ramificado. Outros monossacarídeos podem aparecer nas cadeias laterais, como: L-galactopiranososes, L-fucopiranososes, D-glucopiranosose, ou 3,4-O-(1-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose, ainda 6-O-(2-aminoetil)-fosfonato. O estudo da variação da cadeia lateral é interessante pela sua eventual capacidade como determinante antigênico (Gorin *et al.*, 1983).

O desenvolvimento das técnicas em Química de Carboidratos ocorreu em paralelo com a determinação estrutural da galactana de moluscos. Estudos estes que começaram com Hammersten em 1885, que isolou de *Helix pomatia* um polissacarídeo ao qual denominou "galactogênio", por não tratar-se de glicogênio. Seu produto de hidrólise era basicamente galactose (May, 1932), que concluiu ainda, pelas técnicas limitadas disponíveis à época, que os polissacarídeos da glândula de albúmen e da massa de ovas eram estruturalmente iguais (May, 1932). O polissacarídeo, metilado (Schlubach *et al.*, 1937), mostrou quantidades equivalentes de unidades di e tetra-O-metil galactose. Baldwin e Bell (1938) determinaram, também por metilação que as ligações existentes no "galactogênio" eram do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). Nesse trabalho os autores propuseram o primeiro modelo estrutural para a galactana, considerando duas possibilidades, ambas com cadeias lineares, sendo uma com cadeia principal ligada (1 \rightarrow 3) e O-6 ramificada, Estrutura 1, ou, uma outra estrutura com cadeia

principal ligada (1→6) e O-3 ramificada, Estrutura 2. Os mesmo autores determinaram a relação de D- e L- galactose no galactogênio em 6:1 com o derivado de benzamidazol (Baldwin *et al.*, 1941), pelo mesmo método com uma relação de 7:1 por May e Weinland (1954), determinada por enzimas hidrolíticas e identificadas por fermentação por Weinland e Nuchterlein, 1954.



Os produtos de hidrólise ácida parcial do polissacarídeo foram estudadas por Weinland (1954), onde observou-se que a L-galactose hidrolisava mais rapidamente que a D-galactose. A produção de oligossacarídeos por hidrólise parcial que depois de separados por cromatografia em papel forneceu 3-O-β-D-galactosil-D-galactose, 6-O-β-D-galactosil-D-galactose, com traços de 6-O-α-L-galactosil-D-galactose, identificados por polarimetria e ponto de fusão.

O estudo de galactanas de moluscos recebeu novo impacto quando da utilização da degradação de Barry (1943), utilizada por O'Colla (1953), que produziu por oxidação com meta-periodato, um polissacarídeo semelhante ao

original, resultados que incompatibilizou o modelo estrutural proposto por Baldwin e Bell (1938), pelo qual presumia-se que o polímero após degradação seria constituído de apenas uma cadeia principal (1→3). O'Colla, a partir destes resultados, sugeriu um modelo arboriforme para o "galactogênio".

A análise dos oligossacarídeos de hidrólise ácida, oxidação por periodato, e degradações seqüenciadas tipo Barry, foi realizada por Corrêa *et al* (1967), com o polissacarídeo de glândula de albúmen de *Biomphalaria glabrata*. Os resultados demonstram uma estrutura semelhante ao polissacarídeo que O'Colla encontrou em *H. pomatia*.

A metilação e a análise por GLC de seus derivados alditól acetatos, a partir dos trabalhos de Lindberg (Hellerqvist *et al.*, 1968), possibilitou um novo ritmo na busca de uma estrutura para a galactana de glândula de albúmen de molusco. Os estudos de metilação começaram com Duarte e Jones (1971), em galactogênio de *Strophocheilus oblongus*, através dos derivados metilados e de degradações controladas de Smith, fortalecendo o modelo estrutural arboriforme, entretanto, com adição de partes lineares β -(1→3) e β -(1→6). Para identificação dos derivados metilados foi utilizado GLC e isolamento em coluna de sílica gel. O estudo dos polissacarídeos resultantes de degradações sucessivas, e a análise dos derivados metilados de cada material resultante de degradação (Segura *et al.*, 1976), demonstrou a possibilidade de cadeias lineares de ligação (1→3) pelo aumento do derivado 2,4,6-tri-O-metilado. Semelhante estratégia foi utilizada para a galactana de *M. paranaguensis* que foi submetida a degradação seqüenciada de Smith (Moretto *et al.*, 1979) e os polissacarídeos resultantes analisados por metilação, cujos resultados compatibilizaram com os obtidos para *S. oblongus*,

atingindo depois da terceira degradação um total de 72% de unidades 3-O-substituídas e 12% de grupos terminais não redutores de galactopiranosose.

A metilação foi ainda ferramenta de análise dos polissacarídeos de *Megalobulimus paranaguensis* (Honda *et al.*, 1978) cujos oligossacarídeos obtidos de hidrólise ácida parcial e isolados por cromatografia em papel e coluna de carvão, foram utilizados como ajuda na determinação estrutural. Constituindo de tetra a heptassacarídeos apresentando cadeias de unidades (1→3), com unidade terminal não redutora de ligação (1→6), e analisados por oxidação de periodato, metilação e rotação óptica, foram encontrados os seguintes compostos: 3-O-β-D-galactopiranosil-D-galactopiranosose, 6-O-β-D-galactopiranosil-D-galactopiranosose, β-D-galactopiranosil-β-(1→3)-β-D-galactopiranosil-β-(1→3)-D-galactopiranosose, β-D-galactopiranosil-β-(1→6)-D-galactopiranosil-β-(1→6)-D-galactopiranosose, β-D-galactopiranosil-β-(1→6)-D-galactopiranosil-β-(1→6)-D-galactopiranosil-(1→3)-D-galactopiranosose, β-D-galactopiranosil-β-(1→3)-D-galactopiranosil-β-(1→3)-D-galactopiranosil-(1→3)-D-galactopiranosose. Foram ainda isolados por cromatografia em papel, segundo metodologia de French e Wild (1953, in French *et al.*, 1966), outros oligossacarídeos que se apresentaram como duas distintas séries homólogas. Uma linear com tri-, tetra-, penta- e hexassacarídeos sempre com cadeia β-(1→3) com exceção da unidade terminal não redutora que apresenta ligação tipo β-(1→6); e outra série ramificada com tri-, tetra-, penta-, hexa- e heptassacarídeos com cadeia principal β-(1→3) ligadas apresentando ponto de ramificação no carbono C-6.

Oligossacarídeos glicosil-gliceróis provenientes da segunda degradação seqüenciada tipo Smith da glândula de albúmen de *M. paranaguensis* foram

isolados e analisados (Iacomini *et al.*, 1980). A partir dos derivados metilados de cada oligossacarídeo pode-se concluir que se tratavam dos seguintes compostos:

- O-β-D-galactopiranosil-(1↔1)-glicerol
- O-β-D-galactopiranosil-(1↔6)-β-D-galactopiranosil-(1↔1)-glicerol
- O-β-D-galactopiranosil-(1→3)-β-D-galactopiranosil-(1↔1)-glicerol
- O-β-D-galactopiranosil-(1→3)-β-D-galactopiranosil-(1→3)-β-D-galactopiranosil-(1↔1)-glicerol
- O-β-D-galactopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosil-(1↔1)-glicerol
- O-β-D-galactopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosil-(1→3)-β-D-galactopiranosil-(1↔1)-glicerol

Ainda foram identificados outros óligos que por análise da metilação concluiu-se participarem de uma série de glicosil-gliceróis ramificados, na forma de heptassacarídeos.

Por esta técnica foram pesquisadas ainda as galactanas de *Ampullarius* sp. (*Pomacea lineata*), (Feijó *et al.*, 1975; Gorin *et al.*, 1980; Petiz 1977; Borges 1977). Na galactana deste, foi observada a presença de carboxi-etilideno envolvendo os carbonos C-3 e C-4, das unidades terminais não redutoras de galactose (Gorin *et al.*, 1983).

A galactana da glândula de albúmen de *M. paranaguensis* foi estudada por RMN a partir do mesmo procedimento de extração e purificação empregando Cetavlon, Corrêa *et al.*, 1967 (Fontana *et al.*, 1985). O polissacarídeo isolado apresentou espectro de RMN mostrado na Figura 3, que foi realizado em equipamento de 100MHz para o próton ou o equivalente a 25MHz para o isótopo

13 do carbono, em D₂O, sem alteração de pH. A hidrólise parcial com ácido trifluoracético M seguida de separação por coluna de celulose, forneceu dois conjuntos de oligossacarídeos, denominados de fração A e C, correspondendo a massa de di-, tri-, e tetrassacarídeos, com ésteres de ácido (2-aminoetil) fosfônico ligados.

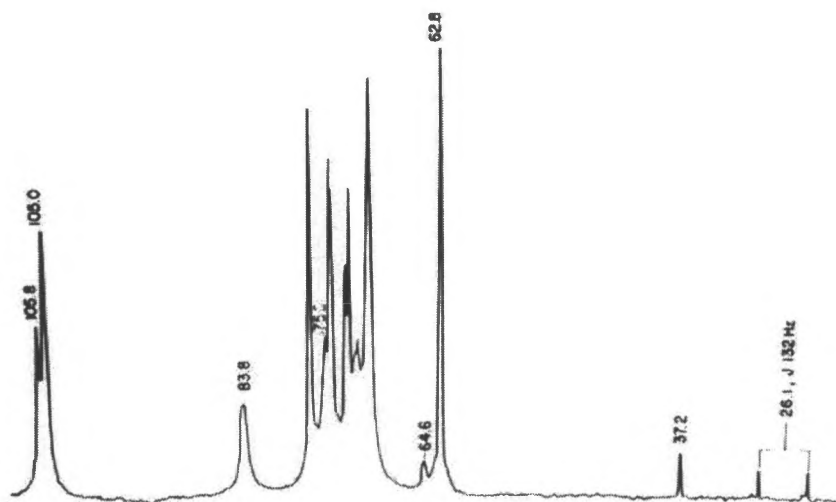


FIGURA 3: ESPECTRO DE ¹³C-RMN DO POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *M. PARANAGUENSIS*, A FREQUÊNCIA DE 25MHZ EM D₂O, A A TEMPERATURA DE 70°C.

A presença de D- e L-Galp na galactana de massa de ovos e glândula de albúmen de *H. pomatia*, foi primeiramente sugerida por Baldwin e Bell (1938), que forneceu produtos de hidrólise com rotação óptica de $[\alpha]_D^{20} +54^\circ$, incompatível com a D-galactose mutarrotada que é de $[\alpha]_D^{20} +80^\circ$, ainda que os autores não tenham isolado um derivado de L-galactose. Contudo, lograram êxito ao isolar um derivado 2-benzaminazólico de L-galactose (Bell e Baldwin, 1941); a razão de D- e L- isômeros foi calculada em 6:1 respectivamente, quantidades próximas às encontradas posteriormente para as galactanas de glândulas de albúmen (May e

Weinland, 1954 e 1956). Os mesmos autores determinaram a presença de L-galactose nos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida, e assumiram que as unidades terminais não redutoras de D-Gal eram ligados em β - e que as de L-Gal estariam ligadas em α - (May e Weinland, 1956).

Não foi encontrado L-galactose na galactana de glândula de albúmen de *B. glabrata*, utilizando enzimas específicas (Iacomini *et al.*, 1981). Outras galactanas de caramujos, como aquelas de *Lymnea stagnalis* da família Basommatophora, ordem Pulmonata (Fleitz e Horstmann, 1967) e *S. oblongus* (Duarte e Jones, 1971), não contém L-Gal. Contudo 11,8% de galactose na forma L- foi encontrada em outras espécies, utilizando uma coluna de fase quiral para GLC com derivados trifloroacetil-metil glicosídicos, em um polissacarídeo isolado da massa de ovas que contém 20% de fucose, 16% de HexA e 6,5% de HexN (Bretting *et al.*, 1985).

Já a galactana de *Ampullarius* sp. contém 98% de D-Gal e 2% de L-Fuc (Feijó e Duarte, 1975).

Na família Helicidae foi encontrado de 12 a 14% de L-galactose na galactana nativa, valores altos se comparado aos encontrados para *A. fulica* e *Arion* sp. que apresentaram apenas traços (Bretting *et al.*, 1985). Para *H. pomatia*, a L-galactose, após uma dregadação controlada de Smith, não foi detectada em quantidades acima de 0,1% (Bretting *et al.*, 1985).

2.1.1.1 Biossíntese

Os caracóis adultos sintetizam em suas glândulas de albúmen a galactana como polissacarídeo de reserva, cuja presença nas ovas justifica-se para o desenvolvimento dos embriões. Diferentes enzimas participam deste processo.

Para iniciá-lo o mais provável é que seja necessário um iniciador baseado em D-Galp no ao qual unidades de D-Gal serão transferidos de UDP-Gal (Goudsmit e Ashwell, 1965). Mais do que uma enzima está envolvida na formação das ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6). A partir de extratos de glândula de albúmen de *L. stagnalis* foi isolada uma UDP-Gal: β -galactosídeo β -(1 \rightarrow 3)-galactosiltransferase, que é capaz de transferir unidades de galactose de UDP-Gal a unidades terminais não redutoras de galactose (Joziasse *et al.*, 1987).

De *B. glabrata*, foi isolada uma eficiente β -(1 \rightarrow 6) galactosiltransferase (Stangier *et al.*, 1995), que foi capaz de inserir a partir de [6-3H]-uridina 5-difosfogalactose, novas unidades de D-Gal ao oligossacarídeo 3-O- β -D-galactopiranosil)- β -D-galactopiranosídeo. A substituição nesta penúltima unidade levou a um oligossacarídeo ramificado, confirmado por ^1H -RMN e análise de metilação.

Em moluscos da sub-classe Pulmonata, família Helicidae, em análise de metilação, 1,2-di-O-acetil-3,4,6-tri-O-metilgalactopiranosose foi detectado, além de outros derivados, indicando uma ligação (1 \rightarrow 2). Nestes a L-Gal é encontrada exclusivamente nas extremidades não redutoras (Bretting *et al.*, 1985), sendo hidrolisada mais rapidamente da galactana nativa que a D-Gal, e cuja rotação óptica é significativamente negativa (Weinland 1956), indicando uma ligação α -. Lüttge *et al.*, 1997, isolou das glândulas de albúmen de *H. pomatia* uma α -(1 \rightarrow 2)-L-galactosiltransferase.

2.2 Glicolípídeos

Os glicolípídeos podem ser descritos genericamente como compostos com uma ou mais unidades de monossacarídeos ligados por ligação glicosídica a uma porção hidrofóbica como um acil-glicerol, uma esfingosina, ceramida (N-acil-esfingosina), ou a um prenil fosfato. São considerados glicoconjugados, como as glicoproteínas, glicopeptídeos, peptídeoglicanas, lipopolissacarídeos o são (Chester, 1998).

A variedade dentro deste grupo de substâncias é grande, com mais de 300 estruturas identificadas, cadeias glicídicas podendo atingir até 20 unidades ou ainda constituintes como o inositol fosfato são possíveis.

Sua nomenclatura deriva do tipo de cadeia hidrofóbica ligada ao carboidrato, quanto a este é denominado da mesma forma que glicoproteínas, glicopeptídeos e peptídeoglicanas (IUPAC-IUBMB, 1985), oligossacarídeos, e carboidratos em geral.

Glicolípídeos são amplamente encontrados na natureza, entretanto são característicos para um determinado grupo de seres vivos (Carter *et al.*, 1965). É encontrado geralmente em membranas celulares como a membrana citoplasmática (Kotchetkov e Smirnova, 1986), mitocondrial, bem como do retículo endoplasmático, e nos vegetais, nas membranas dos cloroplastos.

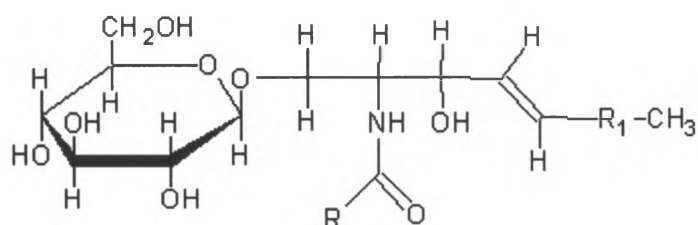
A porção hidrofóbica fica inserida na membrana, enquanto que a porção glicídica fica exposta à face externa, assim os glicolípídeos participam na rigidez da membrana bem como de processos de reconhecimento (Hughes e Sharon, 1978).

Quanto ao número de espécies, os moluscos constituem um dos mais extensos grupos dentro dos invertebrados, atrás apenas dos insetos. A possibilidade de uso como fonte de alimento estimulou a pesquisa em torno da composição lipídica (Kotchetkov e Smirnova, 1986). Foram investigadas 19 famílias de 4 ordens diferentes. A proporção de carboidrato nos extratos lipídicos varia entre 0,7 e 2,9% e pode variar drasticamente dependendo da espécie.

Na classe gastropoda, há a predominância de glicolipídeos polares, e os monossacarídeos mais comuns são a galactose e glucose, com exceção para o molusco marinho desta classe, *Acmea pallida*, que possui a arabinose como maior constituinte, e glucose em pequena quantidade. As ceramidas constituem a maior parte das frações lipídicas, e tem como principais ácidos graxos aqueles entre 16 e 22 carbonos.

Glicoesfingolipídeos

São glicoconjugados que contêm uma longa cadeia amino álcool (esfingosina) *N*-acilada por um ácido graxo ($R'CO_2H$), e um grupo glicosídico, na forma de monossacarídeo ou oligossacarídeo, ligado por uma ligação glicosídica à hidroxila primária da esfingosina ou ceramida.



R= cadeia hidrocarboneto

R1= $(CH_2)_{12}$

3

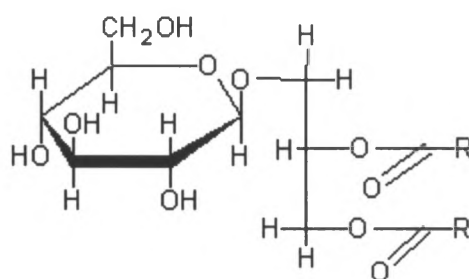
Os glicoesfingolípídeos podem ser divididos em: glicoesfingolípídeos neutros, como o representado na estrutura 3, estes subdivididos como mono-, oligo-, ou poliglicosilesfingosina, ou mono-oligo-, e poliglicosilceramidas; e glicoesfingolípídeos acídicos; sialoglicoesfingolípídeos (gangliosídeos, contendo uma ou mais unidades de ácido siálico), uronoglicoesfingolípídeos (com uma ou mais unidades de ácido urônico), sulfoglicoesfingolípídeos (com uma ou mais unidades de éster de carboidrato sulfatado), fosfoglicoesfingolípídeo (com um ou mais grupos mono- ou diester fosfato), e fosfonoglicoesfingolípídeo (com a presença de uma ou mais unidades de do grupo (2-aminoetil)hidroxifosforílico) (Chester, 1998).

Nos mamíferos os glicoesfingolípídeos se inserem na membrana celular (Critchley *et al.*, 1973; Klenk e Choppin, 1970), organizada como as ceramidas, com a porção lipídica atravessando a bicamada da membrana, contribuindo para a sua rigidez. A porção hidrofílica de carboidrato fica localizada na superfície externa da membrana. (Karlsson *et al.*, 1977)

A função biológica destes compostos está relacionada nos mamíferos com sua rigidez, interação com outras células participando de processos de reconhecimento. São antígenos de superfície, ou marcadores de diferenciação celular; participam no controle de crescimento e na transformação oncogênica (Fishmann e Brady, 1976), entre outras funções biológicas.

Glicosilglicerolípídeos

Glicosilglicerolípídeos são o outro subgrupo, contendo um glicerol acilado por ácidos graxos, e uma unidade monossacarídica ou oligossacarídica glicosilando uma hidroxila primária de uma unidade de glicerol.



4

R= cadeia de hidrocarboneto

Apresentam uma heterogeneidade maior quanto ao número e tipo de monossacarídeos ligados à cadeia lipídica, representados por R, na Estrutura 4. A presença de grupos sulfônicos ou sulfatos associados a galactose e a 6-desoxi-D-glucopiranosose é comum em alguns glicoglicerolípídeo, como nos sulfolípídeos de plantas, α -D-sulfoquinovosil-(1 \rightarrow 1)-diacilglicerol (Benson, 1963). Levantamento bibliográfico atualizado, mostra que raros trabalhos estão presentes na literatura sobre glicolípídeos de moluscos, em particular de *A. fulica* com o qual nada foi descrito para estas estruturas.

2.2.1 Caracterização Estrutural de Glicolípídeos

A determinação estrutural é realizada primeiramente em conjunto e depois cada parte, carboidrato e cadeia hidrofóbica, separadamente pelas técnicas usuais inerentes a cada grupo.

A esfingosina pode ser identificada por CCD, na forma de base livre ou ainda como derivado 2,4-dinitrofenil (Karlsson e Martensson, 1968). Métodos colorimétricos podem ser usados baseados na formação de cor com laranja de metila (Carter *et al.*, 1965). A determinação da composição de ácidos graxos é usualmente realizada a partir dos metil ésteres, por GLC, com tratamento do glicolípido por MeOH-HCl (Makita e Yamakawa, 1962). Para aumentar a volatilidade dos metil ésteres dos α -hidroxi ácidos, eles são metilados ou trimetilsililados (Capella *et al.*, 1968).

3 ESTRATÉGIAS DE DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE CARBOIDRATOS E GLICOCONJUGADOS POR ESPECTROSCOPIA DE RMN

A determinação da estrutural de carboidratos até os anos 70, era realizada basicamente por análises químicas (Aspinall 1982), que exigiam uma demanda de amostra relativamente grande, de execução laboriosa, e por vezes de resultados não fielmente reproduzíveis (Dutton *et al.*, 1982). O desenvolvimento tecnológico influenciou de maneira substancial a elucidação de estruturas de carboidratos de complexa construção e de glicoconjugados, como a espectrometria de massa adaptada a cromatografia gasosa a partir de 1964 (Laine 1990), e com impacto maior ainda a espectroscopia de RMN.

TABELA 1: COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS ANALÍTICAS DA QUÍMICA DE CARBOIDRATOS

Método	Vantagens e limitações
Análise química	Quantifica as unidades de açúcar presentes; permite a determinação da configuração absoluta dos diastereoisômeros glicosilados (D- ou L- isômeros). Destrutiva
Análise de metilação	Define os açúcares Terminais, pontos de ramificação e posição das ligações. Não informa a seqüência. Destrutiva
Espectrometria de massa (FAB-MS, MALDI-TOF, ESI-MS)	Informações confiáveis da composição do açúcar e dos substituintes não carboidratos. Pode ou não informar a seqüência. Tipo de açúcar não definido. Não informa sobre configuração anomérica, e informações sobre o tamanho do anel são indiretas. Destrutiva
Espectroscopia de RMN	Muitos sinais indicam o tipo de açúcar e a configuração anomérica, a seqüência e a ligação podem ser obtidas. Açúcares incomuns podem ser identificados e a posição de substituintes não carboidratos pode ser definida. Não destrutiva

A espectroscopia de RMN do isótopo ^{13}C do carbono (^{13}C -RMN) tem grande utilização diretamente na determinação imediata de carboidratos, ou ainda associada a outras técnicas clássicas de química de carboidratos. Os resultados de ^{13}C -RMN podem contribuir para a determinação por assinalamento dos deslocamentos químicos dos tipos diferentes de unidades de um polissacarídeo, ou ainda como "fingerprint" característico de determinada estrutura, com aplicação taxonômica por exemplo (Gorin e Spencer, 1970). Com sinais bem resolvidos em uma ampla janela espectral os espectros de ^{13}C -RMN são razoavelmente interpretados, porém limitações quanto a sobreposição de ressonâncias e a quantidade de amostra exigem protocolos diferenciados.

TABELA 2: RESPOSTAS DOS ESPECTROS UNIDIMENSIONAIS

Pureza	Não gasta tempo com outras técnicas mais demoradas. Pode ser com RMN de próton, onde a presença de ressonâncias alheias aos sinais esperados indica impurezas ou de substituintes não carboidrato.
Número de resíduos	O número de ressonâncias na região anomérica sugere o número de unidades. Pode usar o DEPT de ^{13}C , para contabilizar os CH_2 de C-6 presentes e os respectivos C-1.
Substituintes	Pode usar espectros de próton, carbono ou fósforo, com sinais característicos. Carbonos substituídos normalmente têm seu δ modificado.
Configuração	São três métodos comumente aplicados: correlação de deslocamento químico, determinação de $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2}$ ou de $^1J_{\text{C}_1,\text{H}_1}$

Oligossacarídeos naturais ou produtos de hidrólise de um polissacarídeo original, podem ser usados na determinação por ^{13}C -RMN dos sinais constituintes do mesmo (Colson *et al.*, 1974). Este tipo de estratégia é muito

usual, contudo, a sobreposição de sinais inviabiliza a determinação de todos os deslocamentos químicos (Bernstein, 1983).

A ressonância de ^{13}C -RMN foi utilizada na determinação da estrutura de glucana de *Tremella mesenterica* (Jennings *et al.*, 1973), com ligações (1→4) e (1→6). A glucana com sinais em δ 101,6, δ 101,0 e δ 99,2 foi comparada quando a configuração anomérica aos padrões de:

- maltitol, 4-O- α -D-glucopiranosil-D-glucitol com sinal em δ 101,7 para a extremidade não redutora
- isomaltose, 6-O- α -D-glucopiranosil-D-glucopiranosose, δ 99,3 para a extremidade não redutora ligada ao C-6.
- panose, O- α -D-glucopiranosil-(1→6)-O- α -D-glucopiranosose-(1→4)-O- α -D-glucopiranosose δ 99,3 para a extremidade não redutora ligada no C-6 da glucopiranosose com δ 101, O- ligada à extremidade redutora em C-4 desta.
- Maltose, 4-O- α -D-glucopiranosil-D-glucopiranosose, com C-1 não redutor em δ 100,8

Padrão de amilose foi utilizado para determinar a cadeia ligada (1→4), quanto ao carbono anomérico e o deslocamento químico de C-4 e C-6 não substituído. Concluiu-se que os sinais anoméricos de C-1 das unidades α -(1→4) e das unidades ligadas a glucopiranososes substituídas em α -(1→4) e ligadas por C-1 em uma unidade C-6 substituída têm deslocamento químico entre δ 101,6 e δ 101,0, e δ 99,2 , respectivamente.

Bernstein *et al.*, sugeriram protocolo para a determinação estrutural de oligossacarídeos baseado na derivatização destes em derivados metilados, onde

o grupo metil seria constituído de três átomos de deutério em substituição ao hidrogênio, assim produzindo espectros de ^{13}C -RMN e de espectroscopia de próton (^1H -RMN) com linhas melhor resolvidas e com inhomogeneidade de campo menor que a produzidas em solvente de óxido de deutério (D_2O , água deuterada) (Bernstein e Hall, 1982). Para resolver as sobreposições de sinais, os autores realizaram experimentos em duas dimensões, aproveitando os acoplamentos entre prótons entre si, e entre prótons e ^{13}C .

TABELA 3: ALGUNS DOS PRINCIPAIS EXPERIMENTOS BIDIMENSIONAIS E INFORMAÇÕES NA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE CARBOIDRATOS

Experimento	Irradiado/observado	Informação
COSY	^1H - ^1H	Acoplamento entre prótons vicinais
TOCSY	^1H - ^1H	Correlação entre prótons vicinais e próximos, dentro do anel
ROESY	^1H - ^1H	Correlações espaciais entre prótons próximos mas que não compartilham elétrons
HMQC	^1H - ^{13}C	Acoplamento entre um próton e seu carbono diretamente ligado
HMBC	^1H - ^{13}C	Acoplamento entre prótons e seus carbonos próximos, dentro do anel ou no espaço

O protocolo utilizado por Jones (1994), envolve técnicas monodimensionais, como ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e ^{31}P -RMN, e bidimensionais como HMQC (ou ainda HSQC) para gerar um espectro de ^{13}C -RMN quando pequenas quantidades de material estão disponíveis, DQF-COSY (Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy) na medida das constantes de acoplamento entre

prótons vicinais, TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) na determinação dos deslocamentos químicos (δ) e assinalamento dos prótons das inidades, e ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) na determinação da ligação glicosídica.

A grande quantidade de oligossacarídeos com deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C determinados (Gorin *et al.*, 1981), o implemento de resolução de equipamentos sofisticados possibilitando a aplicação de técnicas bidimensionais que resolvem boa parte das sobreposições de prótons e carbonos, torna a determinação da estrutura de polissacarídeos mais rápida e completa (Bernstein 1983, Gorin 1981). O conjunto de experimentos otimizados agiliza a determinação estrutural de glicolipídeos (Evans, 1996; Inagaki, 1992; Machado, 1996), glicoproteínas (Vliegenthart 1997); oligossacarídeos (Agrawal, 1992) e polissacarídeos (Gorin 1981; Barreto-Bergter e Gorin, 1983; Jones, 1994)

4 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Extrair, isolar, e caracterizar estruturas polissacarídicas e glicoconjugados de origem natural, utilizando como fonte as glândulas de albúmen do molusco *A. fulica*. Para tanto, serão analisados os componentes das frações aquosa e lipídica:

Objetivos Específicos

- Da fração aquosa, isolar e identificar polissacarídeo, seus produtos de degradação sequenciada de Smith, produtos de hidrólise parcial, e por técnicas de ressonância magnética nuclear mono ($^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$) e bidimensionais (COSY, TOCSY, HMQC, e, ROESY), CG-EM, e espectrometria de MS, caracterizá-los quanto a sua:
 - ✓ Composição qualitativa e quantitativa: natureza e número de constituintes monossacarídeos
 - ✓ Tipo de anel presente nos constituintes monossacarídeos
 - ✓ Configurações das ligações glicosídicas: α ou β ;
 - ✓ Tipo das ligações glicosídicas quanto ao carbono envolvido;
 - ✓ Seqüência das unidades de monossacarídeos, incluindo a ocorrência de pontos de ramificação

✓ Estabelecer estudos comparativos com estruturas polissacarídicas isoladas de outros moluscos.

- Por meio de processos extrativos consecutivos isolar da fração lipídica, glicoglicerolípídeo, identificando-o e caracterizando-o estruturalmente quanto ao carboidrato e quanto a composição dos ácidos graxos, utilizando técnicas de RMN, mono (^1H -RMN) e bidimensionais (HMQC), CG-EM

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Métodos Gerais

Foram utilizados neste trabalho, padrões de 3-O- e 6-O- β -D-galactopiranosil-galactopiranoose, cedidos pelo Dr. P. A. J. Gorin, e a galactana isolada de glândula de albúmen de *M. paranaguensis*, cedida pelo Dr. M. Iacomini.

5.1.1 Cromatografia em Papel (CP) dos Mono e Oligossacarídeos de Galactana de Glândula de Albúmen

Para a galactana e oligossacarídeos provenientes de hidrólise total ou parcial: papel Wathman nº 1 (1 mm) foi utilizado para cromatografia em papel analítica e Watman nº3 (3 mm) para cromatografia preparativa, o solvente utilizado em ambos os casos foi 5:3:3, a saber, *n*-butanol-piridina-água, e reveladas com nitrato de prata-hidróxido de sódio (Trevelyan *et al.*, 1950).

Para glicolipídeos: Cromatografias em CCD (CCD: cromatografia em camada delgada) foram realizadas em placas de alumínio revestidas com silicagel 60 (20 x 20 cm, 0,2 mm; Merck N.5553). o sistema solvente utilizado foi CHCl₃-MeOH-H₂O, na razão de 60:25:4 (Machado, 1996). A detecção dos glicolipídeos foi realizada com coloração pelo método de orcinol/H₂SO₄ (Koscielak *et al.*, 1978).

5.1.2 Cromatografia Gasosa, Espectrômetria de Massa

Foi utilizado o cromatógrafo gasoso marca Varian, modelo 3300, acoplado ao espectrômetro de massa como detector, na faixa entre 20 e 600 m/z, da marca Finnigan modelo ITD800, com impacto eletrônico de 70meV, e sistema detector ITD ("Ion Trap Detector"). As colunas usadas para as análises foram de sílica revestida com fase líquida, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno; diferentes colunas foram usadas.

Para os derivados alditóis acetatos provenientes de hidrólise total da galactana foram analisados na coluna DB-225 (OV-225 compatível), com a seguinte rampa de temperatura: injetor iniciando a 50°C, aguardando nesta temperatura por 1 minuto, quando a temperatura se eleva numa razão de 40°C min⁻¹ até atingir a temperatura de 230° permanecendo assim por 30 min, tempo suficiente para a corrida de pentitóis, hexitóis e inositois acetatos.

Para a análise dos ácidos graxos metanolizados, tanto do extrato orgânico, como dos provenientes da metanólise do glicolípideo, foi utilizada a coluna DB-23 com rampa de temperatura iniciando em 50°C, permanecendo por 1 min, a seguir a coluna atinge 150°C numa razão de 40°C.min⁻¹ permanecendo por 1 min, sobe então para 170°C, a 40°C.min⁻¹ permanecendo novamente 1 min, e por fim, a uma razão de 4°C min⁻¹ atinge 210°C, permanecendo por cerca de 30 min.

5.1.3 Derivados Alditóis Acetatos: Redução e Acetilação

Os monossacarídeos produzidos por hidrólise total do polissacarídeo foram derivatizados na forma de alditóis acetatos voláteis. Para tanto, estes foram

reduzidos com pequena quantidade de boroidreto de sódio (NaBH_4), por cerca de 15 horas, a temperatura ambiente. Ao fim, a solução foi neutralizada com ácido acético, e os íons sódio removidos por resina catiônica DOWEX 50W (fortemente ácida). A solução de alditóis é concentrada a baixa pressão, e o ácido bórico formado, retirado por codestilação com metanol, na forma de borato de trimetila.

A acetilação deste material é realizada com uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v), a temperatura ambiente por 15h (Slonecker 1972). A reação é interrompida com adição de gelo e água gelada, os alditóis acetatos formados são separados por fase em clorofórmio. Para eliminar a piridina residual a fração orgânica foi submetida a separação alternada de água gelada e solução a 3% de sulfato de cobre, até coloração negativa (solução de CuSO_4 permanece azul claro). A fase clorofórmica é separada e seca, e os acetatos de alditóis assim formados, prontos para a análise em cromatógrafo gasoso.

5.1.4 Metanólise do Glicolípideo

O glicolípideo após todas as análises não destrutivas (RMN), foi submetido a metanólise em solução de HCl a 3% em metanol sob aquecimento de 80°C por 1 h. Ao fim deste tempo, foi adicionado à solução resfriada, quantidade de clorofórmio e água gelada. Da fase orgânica retirou-se o conjunto de ésteres metílicos, analisados por CG-EM, e da fase aquosa, o constituinte monossacarídico, que após hidrólise ácida total, redução e acetilação foi da mesma maneira analisado por CG-EM.

5.2 Processos de Extração

Dissecação dos moluscos. 18 espécimes do mesmo lote fornecidos pela empresa beneficiadora de escargot Changrinet LTDA, foram descongelados e imediatamente dissecados, retirando separadamente as glândulas de albúmen, o coração-pulmão, bem como o aparelho digestivo; os órgãos extraídos foram colocados em frascos com acetona (agente desidratante) onde permaneceram por 24 h. Para pesagem as glândulas foram secas por alguns minutos sobre papel toalha, contra fluxo de ar levemente aquecido; o peso obtido foi de 19.6 g. As glândulas foram então moidas em Blender, numa solução de CHCl_3 -MeOH 2:1, e em seguida submetidas a extração a 60°C em refluxo por 4 h, neste mesmo solvente. O material era filtrado e o resíduo foi submetido a nova extração por mais duas vezes. O filtrados de cada extração foram unidos e secos a temperatura de cerca de 40°C, e, cromatografados em CCD. O peso desta fração foi de 450 mg, e foi denominada de **ACAf**; a composição de ácidos graxos desta fração foi obtida por CG-EM.

O resíduo, 10,4 g, denominado de **BA**, foi submetido a novos processos extrativos para obtenção da galactana, e uma alíquota foi utilizada para análise de ^{13}C -RMN. Um fluxograma do processo de extração se encontra na Figura 4.

5.2.1 Obtenção do Glicolipídio a partir da fração **ACAf** de Glândula de Albúmen de *A. fulica*

A fração **ACAf**, correspondendo aos extratos lipídicos brutos somados, foi submetida ao procedimento de Folch (Folch *et al.*, 1957). O método de purificação consiste em adicionar solução de cloreto de potássio 0,1M em volume equivalente

a cerca de um quinto do volume total. A mistura obtida foi transferida para funil de separação, agitada vigorosamente por 3 min. Após repouso há a separação das fases. Cada fase era então submetida a nova purificação, utilizando-se como solvente as fases teóricas de CHCl_3 :MeOH:KCl 0,1 M, em proporções de 0,3:4,8:4,7 e 8,6:1,4:0,1, respectivamente para as fases inferior e superior, em volume suficiente para restituir o volume inicial (Machado, 1996). O procedimento todo foi realizado duas vezes consecutivas, e as fases obtidas foram reunidas, superior com superior e inferior ídem. Para cada uma foi realizada CCD, com revelação por orcinol, na busca de glicolipídeos, assim, a camada inferior foi evaporada até *secura* e submetida a fracionamento.

Uma coluna de ácido silícico foi empregada para o isolamento de glicolipídios. O material dissolvido em CHCl_3 , na proporção de 10 mg/g, fração/ác. Silício), foram aplicadas e eluidas com cerca de 100 ml de solvente de metanol em clorofórmio com razão de metanol a 5, 10, 15, 20, 25, 30%. O processo de isolamento foi acompanhado por CCD, e, as frações com mesma composição foram reunidas e re-purificadas. Por fim, um glicolipídeo foi isolado, identificado primeiramente contra padrão em CCD, indicando ser um monoglicosilglicerídeo. Este produto foi então denominado **A1Af**.

5.2.2 Isolamento da Galactana de Glândula de Albúmen de *A. fulica*

A fração **BA** (10,4g), correspondendo ao resíduo da extração lipídica, foi tratada sucessivamente com uma solução de 2% de NaOH por 4 h a 80°C, a solução resultante foi acidificada com ácido acético aquoso a 4%, seguido por 8h a 40°C, e posterior diálise fechada. O material retido no saco de diálise foi

reprocessado mais duas vezes da mesma maneira, e as águas de diálise foram reunidas. O material assim tratado foi dialisado com saco de poro que retém moléculas de massa molecular acima de 12-16.000, em sistema fechado. A água de diálise, contendo os componentes menores do que o poro, foi concentrada e o material dissolvido nesta levado a secura, este material foi denominado **H2O**dial. O material retido foi denominado **B1S2P3**; este foi levado a pH 7,0 (solução KOH 1M) e adicionado de um sal de amônio quaternário (cetil trimetil amônio, usualmente, Cetavlon); o precipitado formado foi separado por centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos e denominado **p70**. O sobrenadante foi levado a pH 8,5, com tampão borato 3%, e o precipitado formado, foi descomplexado com ácido acético 2M, e precipitado em etanol gelado, e por fim, separado por centrifugação (3.000 rpm, 20 minutos); denominado **p85** forneceu cerca de 8,8g.

5.2.3 Hidrólise Total da Galactana

Os polissacarídeos foram submetidos a hidrólise total para análise da composição monossacarídica, com ácido trifluor acético (TFA) 1,0 M a 100°C, durante 8 horas.

5.2.4 Produção dos Oligossacarídeos por Hidrólise parcial da Galactana

O material do precipitado em pH8,5 (**p85**) foi submetido a hidrólise ácida parcial com TFA 0,1M a 100°C, durante 3 horas (Adams *et al.*, 1962; Aspinall 1982), e cromatografado em papel W1 contra padrões de galactose e rhamnose (Figura 4). Além de galactose, pequenas quantidades de componentes de menor

deslocamento no solvente utilizado (5:3:3) foram observados. Com a intenção de separá-los na busca de oligossacarídeos, os materiais foram separados por cromatografia em papel preparativa e denominados p85-a (Rgal 0,73); p85-b (Rgal 0,45); p85-c (Rgal 0,26); p85-d (Rgal 0,078).

5.2.5 Degradações Sequenciadas da Galactana de Glândula de Albúmen de *A. fulica*

As degradações sequenciais do tipo Smith foram realizadas dissolvendo 1,1 g de polissacarídeo de glândula de albúmen de *A. fulica* em 50 ml de água destilada e adicionado de 50 ml de solução 0,1M de periodato de sódio para uma concentração final de 0,05 M. Esta solução permaneceu durante 72 h ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. O excesso de periodato de sódio da solução foi removido por adição de etileno-glicol (10 ml) e então dialisado contra água corrente por 12 h; seguida de adição 2 mg de boroidreto de sódio até pH 10 para redução dos acetais cíclicos formados, permanecendo por 12 h. O material é neutralizado com ácido acético 2M, em seguida acidificado até pH 2 com ácido acético e submetido a uma hidrólise parcial durante 30 minutos a 100°C sob refluxo, e nova diálise contra água corrente é realizada, permanecendo por 12 horas. O material resultante, retido no saco de diálise é liofilizado, solubilizado em água deuterada (99.95%) e analisado por técnicas de RMN, e em seguida o processo degradativo foi repetido sequencialmente.

5.2.6 Espectrometria de Massa de Spray Eletrônico (ESI-MS) dos Oligossacarídeos de Hidrólise Ácida Parcial de Galactana

Espectros de ESI-MS (Electospray-ionisation-mass spectrometry) foram obtidos com um equipamento Micromass Quattro LC duplo quadrupolo. Espectros foram obtidos no modo íon-negativo, com calibração por Csl. O solvente de análise foi H₂O-HCO₂H 0,05% (v/v)-acetonitrila (1:1). Os óligos foram diluídos em H₂O-HCO₂H 0,05% (v/v), e em seguida diluídos 1:1 com acetonitrila.

Para a aquisição dos espectros foi utilizado uma faixa de massa de 100 a 900 m/z, "inter delay scan" de 0,10 s em sistema de aquisição de data contínuo, tempo de aquisição de 0,20 s a 1,60 s.

5.3 Métodos Espectroscópicos: RMN

As análises estruturais de ressonância magnética nuclear (RMN) mono e bidimensionais foram realizadas em equipamento da marca Bruker, modelo DRX 400, série AVANCE, probe widebore, de 5 mm de diâmetro externo, em diferentes solventes deuterados, a temperaturas de 30°C para glicolípido e oligossacarídeos, 70°C para polissacarídeo nativo, ou degradados de Smith. Foi usado o pico de δ 2,224 da acetona como padrão interno para ¹H-RMN e de δ 30,2 da acetona para ¹³C-RMN. Para análises de ³¹P-RMN, o ácido fosfórico em δ 0,00 foi usado como padrão externo.

Para os experimentos de ¹H-RMN, foi utilizado primeiramente uma sequência de um pulso a 30°, seguido de programa de pulso simples de 90° com sequência de pré-saturação, para ambos: janela espectral de 8250,81 Hz, com frequência para o próton de 400,1319 MHz.

O experimentos de ^{13}C -RMN foram realizados a uma frequência de 100,6185 MHz, janela espectral de 260 PPM.

O experimento de ^{13}C -DEPT acrônimo de "Distortionless Enhancement by Polarization Transfer" (Doddrell *et al.*, 1982), é um experimento que deriva da sequência INEPT ("Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer") (Morris e Freeman, 1979) e usa a técnica de transferência de polarização para observação de núcleos com baixa constante giromagnética (γ), como ^{13}C acoplados a prótons. Com a variação do ângulo de transferência de polarização (θ_z), pode-se proporcionar um espectro seletivo para CH, CH₂, e, CH₃. O θ_z utilizado foi de 135°, e foram obtidos espectros com CH e CH₃ em fase positiva em relação a linha de base e CH₂ negativos. A janela espectral usada foi de 220 PPM, com frequência para o ^{13}C de 100,6185 MHz, e resolução de 32K.

O experimento de COSY (Correlation Spectroscopy) foi realizado segundo Nagayama *et al* (1980), com sequência de presaturação, e ângulo de 45° para o segundo pulso da sequência. Foi utilizado uma matriz de 1K por 1K (f1:f2), e janela de 10,31 por 10,31 PPM.

O TOCSY de "Total Correlation Spectroscopy" foi usado na determinação dos prótons intraresíduos. A sequência de chaveamento de spin (tradução livre de "spin lock") usada foi MLEV-17, com tempo de mistura ("mixing time") de 2,5 msec). (Bax e Davis, 1985).

O experimento HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation spectroscopy), conhecido também como INVERSE, correlacionando prótons a carbonos com $^1J_{\text{H,C}}$ (Bax e Subramanian, 1983; Bax *et al.*, 1986), foi realizado com matriz de 1K por 2K (f1:f2), com 8 pulsos, e janela de 10 PPM por 160 PPM

para ^1H e ^{13}C respectivamente. Do mesmo modo o HMQC-TOCSY realizado para confirmar os assinalamentos da galactana, com o tempo de mistura de 2,5 msec (Lerner e Bax, 1986).

O HMQC-DEPT foi realizado a partir da sequência de HMQC, utilizando a sequência INEPT, com pulso em 180° . Os CH_2 se apresentam como acoplamentos positivos em dupletes com a constante $^1J_{\text{H,C}}$, e os CH e CH_3 , negativo (Kessler *et al.*, 1989).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos desta tese foram realizados no grupo de Química de Carboidratos, no Departamento de Bioquímica da UFPR, que produziu parte substancial do conhecimento sobre galactanas e outros compostos extraídos de caracóis, com varias teses e trabalhos publicados sobre o assunto (Duarte, Corrêa, Iacomini, Feijó, Honda, Petiz, entre outros). Diferentes gêneros, espécies e metodologias foram utilizados no processo contínuo do conhecimento, participando paralelamente ao desenvolvimento das técnicas analíticas envolvidas na determinação estrutural de carboidratos.

O *A. fulica* é um molusco comestível, genericamente denominado de "escargot"; criado para consumo como alimento requintado, encontra mercado em restaurantes paranaenses e de estados vizinhos. Os animais utilizados neste trabalho foram doados pela Changrinet LTDA, maior empresa de abate e comercialização do estado do Paraná, localizada em Colombo, cidade metropolitana de Curitiba.

Para a extração os 20 animais foram descongelados, suas cascas foram cuidadosamente quebradas de maneira a expor a glândula sem danificá-la, que foi removida e mergulhada em acetona. Nem todos os animais possuíam glândula bem desenvolvida, e dos vinte animais 16 glândulas depois de secas pesaram 19,6 g, posteriormente moídas em liquidificador, e submetidas a processo extrativo com CHCl_3 -MeOH (2:1), sob refluxo, para a retirada dos componentes lipídicos. Este procedimento foi repetido três vezes, sempre começando com nova solução de clorofórmio-metanol, juntando os sobrenadantes, como descrito no

item 5.2 de Materiais e Métodos. Obteve-se na fração clorofórmica o total de lipídeos da glândula, analisados por CG-EM, contendo principalmente ácidos esteárico e palmítico, Tabela 8.

O resíduo da extração orgânica, contendo compostos hidrofílicos, carboidratos de baixo peso molecular, polissacarídeos como a galactana, entre outros polissacarídeos.

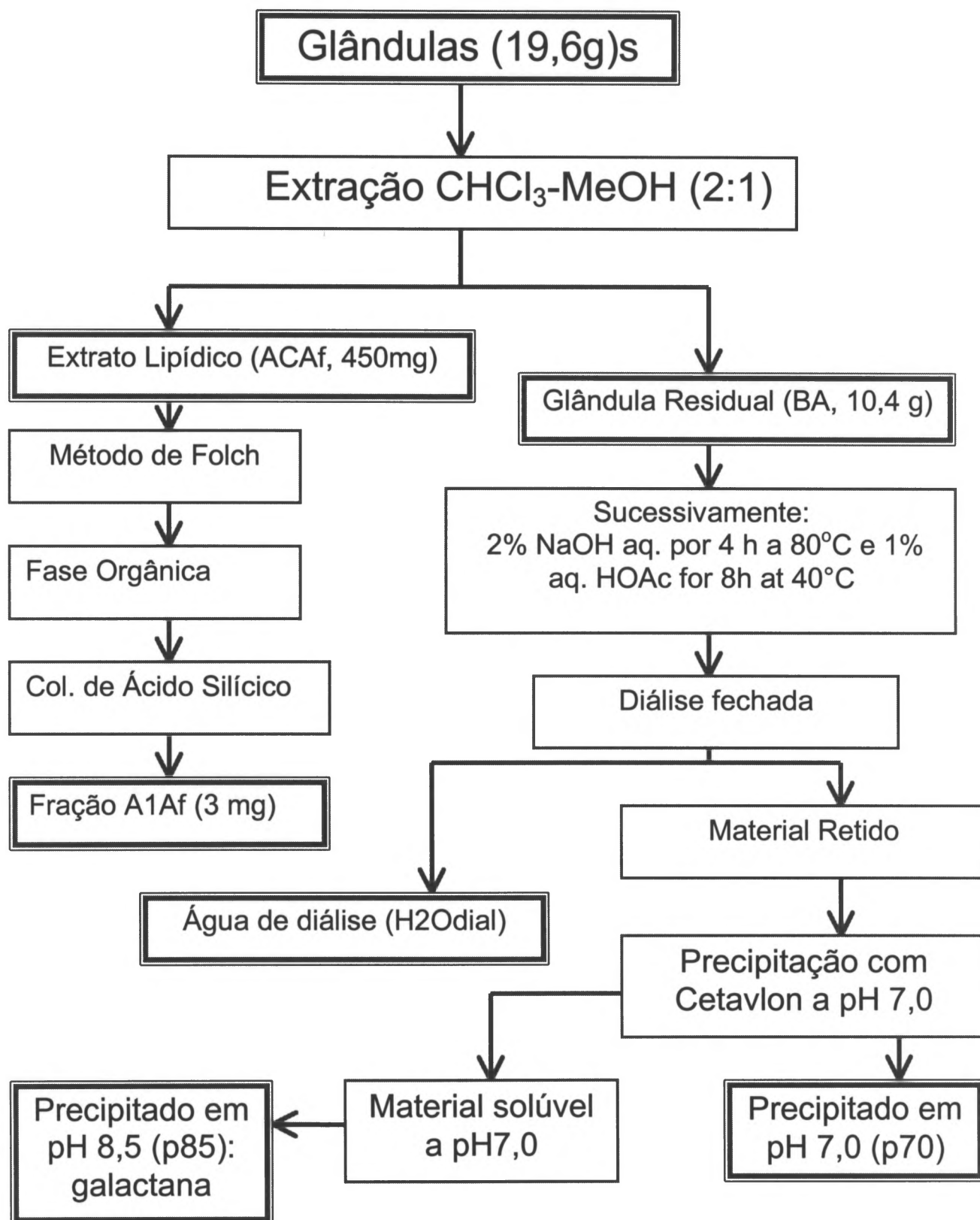


FIGURE 4: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES DE GLICOLIPÍDEO E POLISSACARÍDEOS

6.1 Galactanas de *A. fulica*

Os processos extrativos de galactana de caracóis foram bem estabelecidos (Corrêa *et al.*, 1964, Duarte e Jones, 1971), apesar de variações no método de deproteinização quer seja utilizando enzimas proteolíticas, Sevag, ou ainda, β -eliminação. De qualquer modo, para assegurar sua eficácia, o processo de purificação da galactana foi monitorado por espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, Figura 5 e 6, que serão discutidas à frente.

A partir da glândula residual (**BA**), o passo seguinte foi a desproteinização, que consistiu tratar o resíduo primeiramente com soda, com temperatura de 80°C por 4h, a solução resultante foi acidificada com ácido acético e aquecida a 40°C por 8h, e posterior diálise fechada. O material retido no saco de diálise foi reprocessado mais duas vezes da mesma maneira, e as águas de diálise bem como os materiais insolúveis de cada uma destas três, foram reunidos. Deste modo foram obtidas mais duas frações, o material de baixa massa molecular englobando aí peptídeos, aminoácidos, oligo- e polissacarídeos, material este que foi denominado **H2Odial** (este material foi reservado para estudos posteriores); e outro chamado **B1S2P3**, que foi o que se manteve retido dentro do saco de diálise, e assim com massa molecular maior que 14.000. A fração **B1S2P3** foi purificada por um detergente comumente chamado de cetavlon. Em pH7,0 o material precipitado foi deixado em reserva, e uma vez em pH8,5 o precipitado formado foi separado. A composição monossacarídica realizada por CG-EM dos derivados alditóis acetato do hidrolisado total deste polissacarídeo indicou tratar-se de uma galactana, pois galactose foi o único monossacarídeo encontrado.

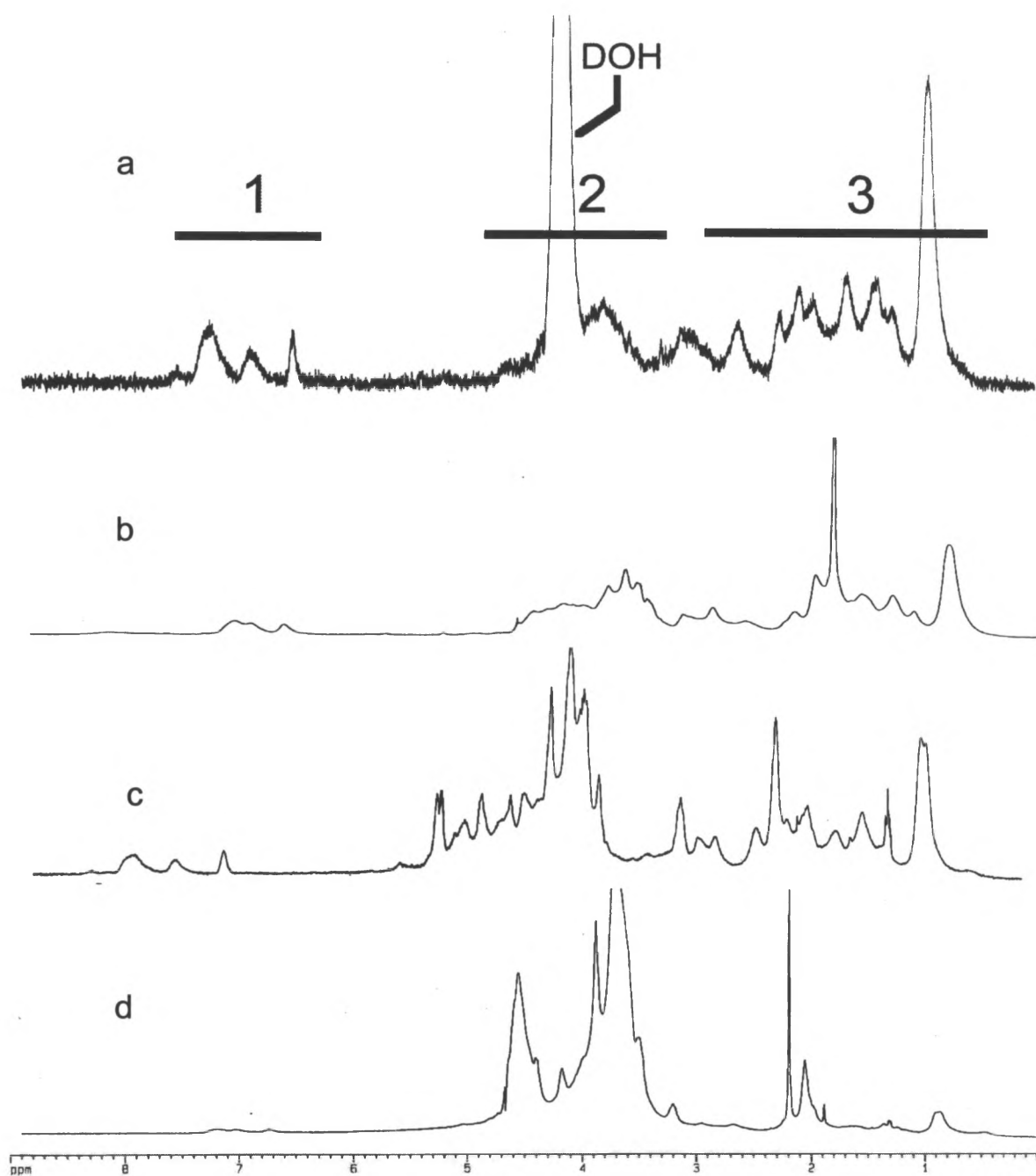


FIGURA 5: ESPECTROS DE ^1H -RMN DE (a) DA FRAÇÃO **BA**, MATERIAL INSOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO-METANOL, (b) DO MATERIAL **H2ODIAL**, CORRESPONDENDO AOS COMPOSTOS DE BAIXO PESO MOLECULAR QUE PASSARAM PELOS POROS DO SACO DE DIÁLISE, (c) DE **B1S2P3**, MATERIAL ANTES DA PURIFICAÇÃO COM CETAVLON, (d) DO PRECIPITADO EM PH8,5, DENOMINADO **P85**.

Observando-se na Figura 5, o espectro de ^1H -RMN da fração **BA**, apresentou grande variedade de sinais que foram agrupados em três regiões principais quanto a deslocamento químico característico de certos radicais. Na região 1, o que geralmente se apresenta na faixa entre 6 a 7 PPM são prótons diretamente ligados a carbonos envolvidos em duplas ligações, e entre 8 a 9 PPM prótons ligados ao nitrogênio (o espectro de COSY desta região compreendendo os acoplamentos de $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^1\text{H}^{\alpha}$ é usual como "fingerprint" para proteínas (Cavanagh *et al.*, 1995)). A Região 2 engloba os prótons de H-1 a H-5 de pentoses e H-1 a H-6 de hexoses bem como H-1 a H-5 dos deoxi-açúcares, além dos prótons de peptídeos e proteínas na região ao redor de 4 PPM. A terceira região é característica de prótons ligados a carbonos de CH_2 e CH_3 , que variam seu deslocamento químico dependendo do substituinte, mas geralmente entre 0 a 3 PPM.

Na Figura 6, pode se observar as regiões características para o deslocamento químico de carbonos em diferentes ambientes químicos. Na região 1, entre 160 e 200 PPM, observa-se a ressonância do carbono de carboxila, ou carbonila de aldeído e cetonas, ésteres. Na região 2, entre 110 e 130 PPM, ressonam carbonos aromáticos de alcenos. A região apresentada como 3, compreendendo os carbonos ligados a hidroxilas, ressonam entre 58 a 115 PPM, encontra-se aí a maior fonte de informação para a análise de carboidratos, pois nesta região do espectro é que se observam os sinais característicos de carboidratos. Os sinais na região 4, entre 40 e 70 PPM correspondem a grupos CH_2 não hidroxilados, e em sua grande maioria a carbonos aminados,

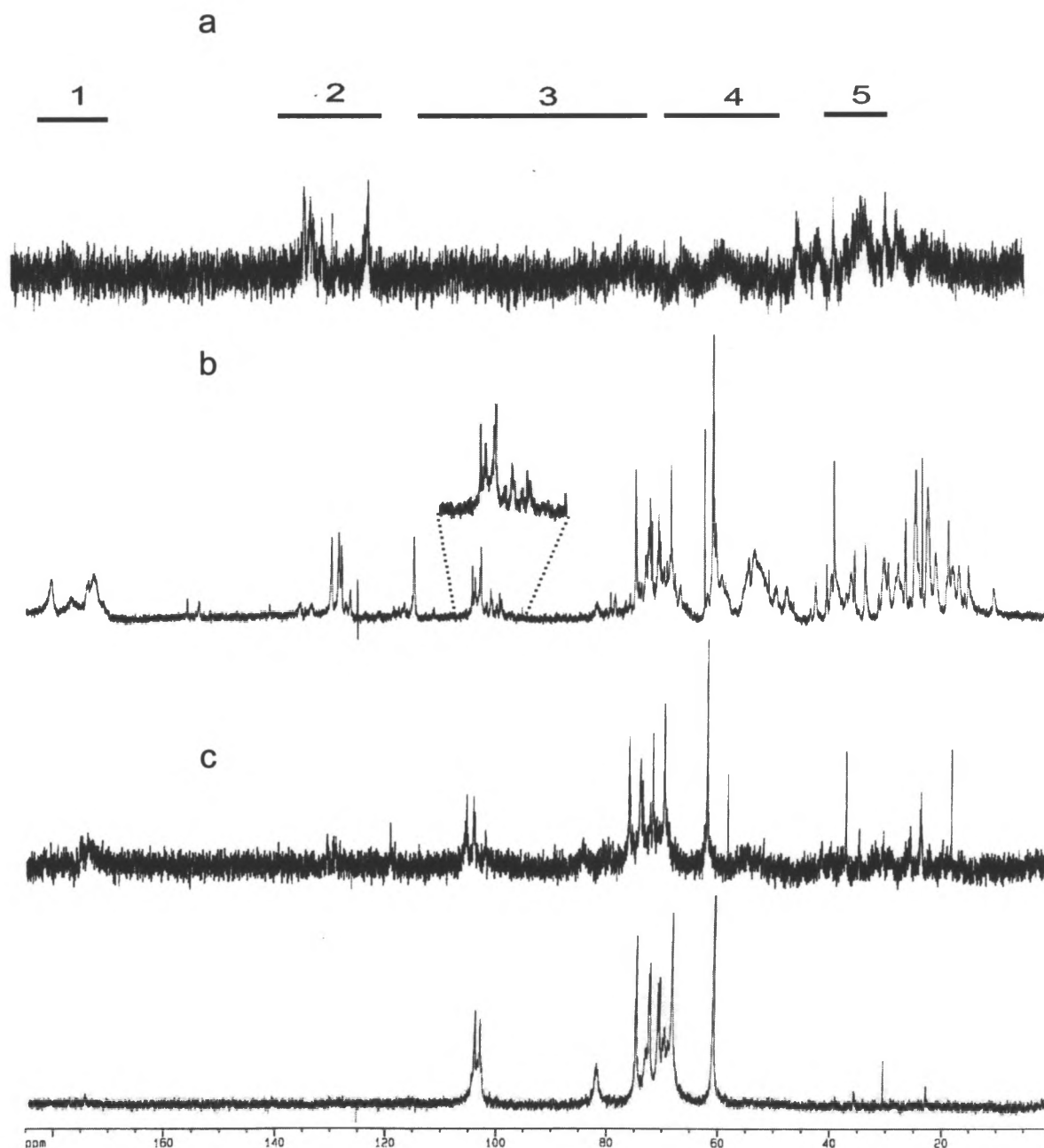


FIGURA 6: ESPECTROS DE ^{13}C -RMN DOS MATERIAIS (a) DA FRAÇÃO BA, MATERIAL INSOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO-METANOL, (b) MATERIAL H2ODIAL, CORRESPONDENDO AOS COMPOSTOS DE BAIXO PESO MOLECULAR QUE PASSARAM PELOS POROS DO SACO DE DIÁLISE, (c) DE B1S2P3, MATERIAL ANTES DA PURIFICAÇÃO COM CETAVLON, (d) DO PRECIPITADO EM PH8,5, DENOMINADO P85.

principalmente de amino ácidos, e peptídeos (Figura 6b), evidenciados devido a sua melhor solubilidade e menor anisotropia de deslocamento químico. Na região 5, entre 0 e 40 PPM, ressonam carbonos de radical metil ligado a diferentes grupos. Esta última região, compreende os sinais de deoxi-açúcares, ramnose e fucose, entre 16 e 18 PPM, além de sinais de metila de grupos acetil (20-25 PPM). Os espectros apresentam graus de pureza crescentes quanto a evidenciação dos sinais referentes a carboidratos.

O espectro de ^{13}C -RMN, Figura 8, é semelhante a galactopirana analisada por Iacomini *et al.*, (in Gorin 1983) e Petiz 1977. O espectro de ^{13}C -RMN obtido foi muito semelhante ao de *Megalobulimus paranaguensis* (Fontana *et al.*, 1985), Figura 7. A galactana de *M. paranaguensis* tinha na sua composição o ácido (2-aminoetil) fosfônico, cujo C-1 diretamente ligado ao fósforo se apresenta com acoplamento de 132Hz centrado em δ 26,1.

Na Figura 9 evidencia a semelhança entre os dois polissacarídeos uma vez que os espectros bidimensionais destes apresentam os mesmos acoplamentos de próton e ^{13}C .

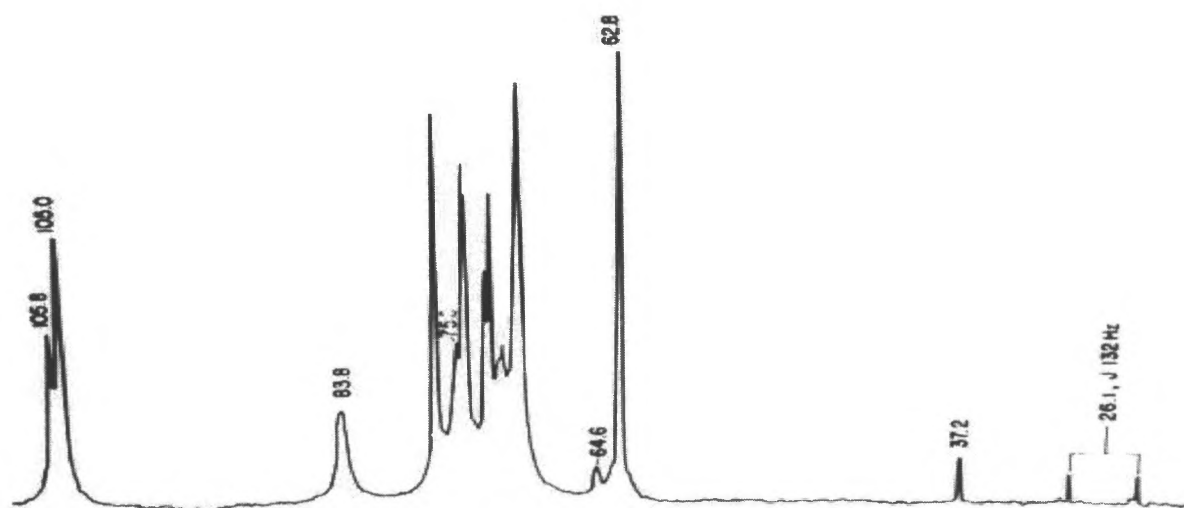


FIGURA 7: ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DE *M. PARANAGUENSIS* (Fontana *et al.*, 1985)

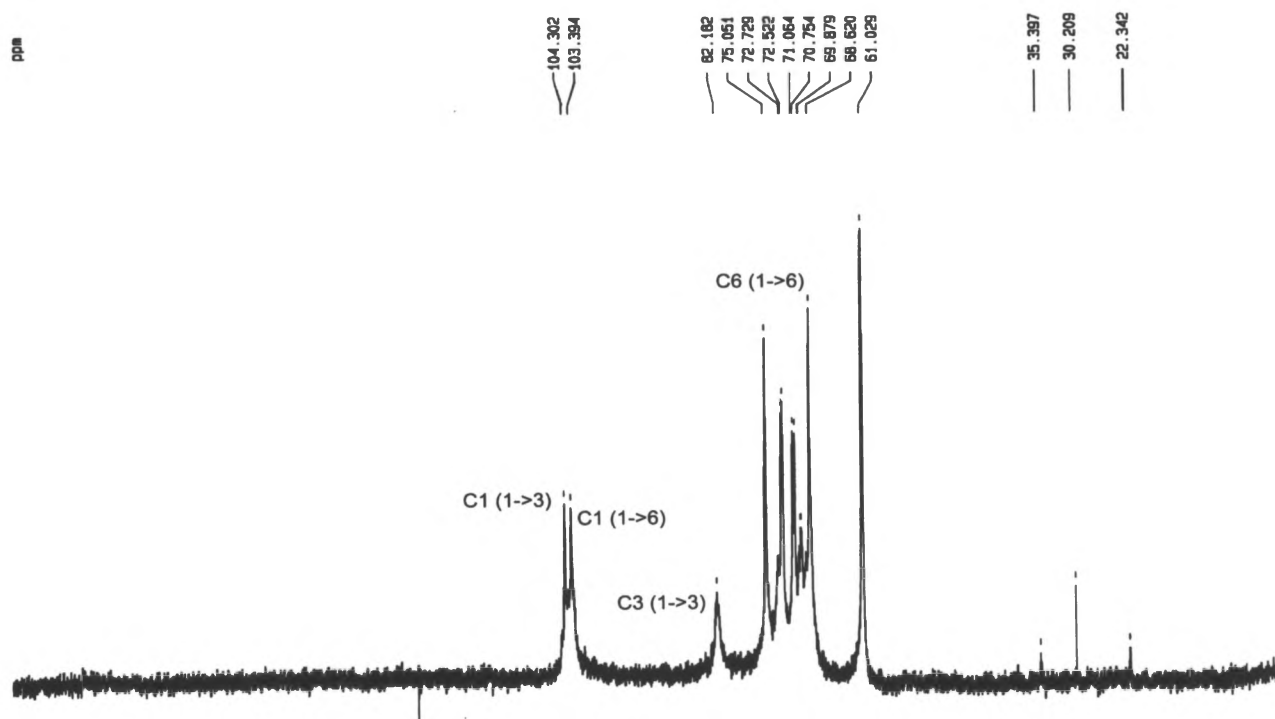


FIGURA 8: ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DA GALACTANA DE *A. FULICA*

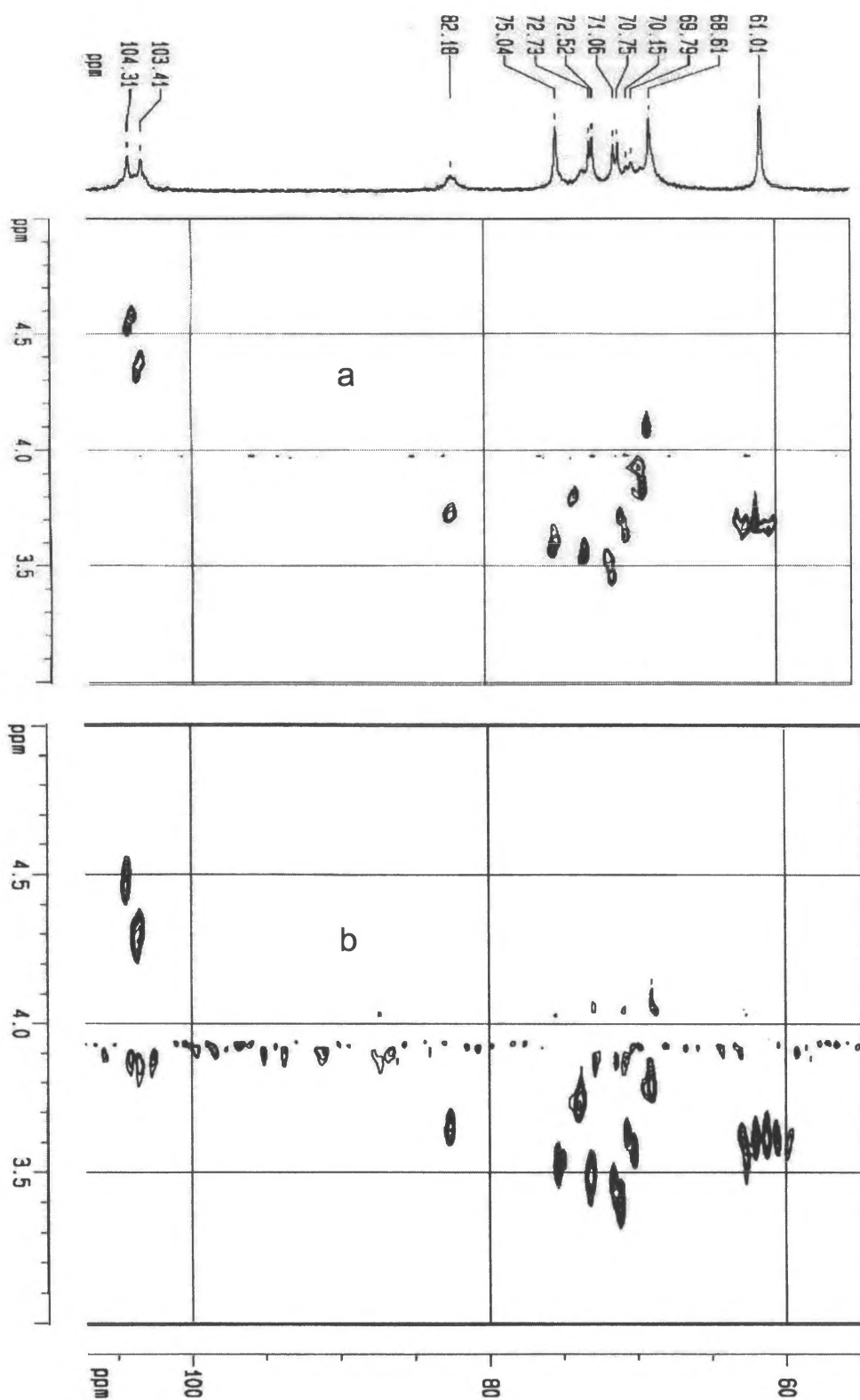


FIGURA 9: ESPECTRO DE HMQC DO POLISSACARÍDEO ISOLADO DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE (a) *M. paranaguensis*, e (b) *A. fulica*

Aplicando o protocolo de Colson *et al* (1974), na determinação estrutural do polissacarídeo íntegro, bem como no assinalamento dos deslocamentos químicos de prótons e carbonos deste foram utilizados os valores obtidos a partir de padrões e também dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise parcial (Honda *et al.*, 1978). Estes oligossacarídeos serviram como bloco estrutural para o polissacarídeo nativo (Gorin, 1981). A descrição dos procedimentos de obtenção dos oligossacarídeos foi apresentada em materiais e métodos, e a sistemática de determinação estrutural por técnicas de RMN mono e bidimensionais é agora demonstrada.

Relembrando, o material do precipitado em pH8,5 (**p85**) foi submetido a hidrólise ácida com TFA 0,1M e cromatografado em papel W1. Além de galactose, pequenas quantidades de componentes de menor deslocamento no solvente utilizado (5:3:3). Com a intenção de separá-los na busca de oligossacarídeos, os materiais foram separados por cromatografia em papel preparativa e denominados p85-a (Rgal 0,73); p85-b (Rgal 0,45); p85-c (Rgal 0,26); p85-d (Rgal 0,078), como indicado na Figura 10.

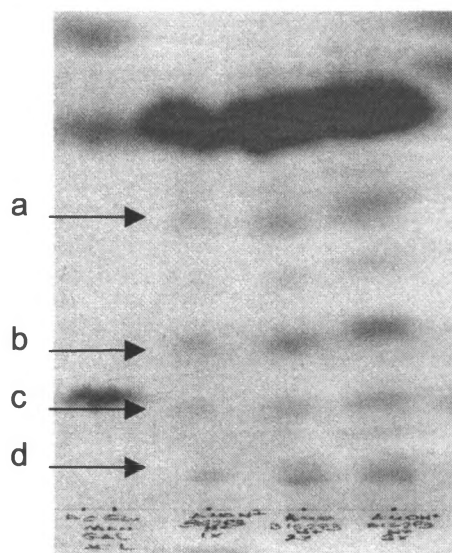


FIGURA 10: CP ANALÍTICA DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA GALACTANA DA GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *A. fulica*

Os oligossacarídeos de hidrólise parcial foram analisados por técnicas de RMN, e os resultados foram os seguintes:

p85-a: diferentes técnicas de RMN foram utilizadas na determinação da estrutura deste oligossacarídeo. O espectro de ^1H -RMN demonstrou a presença de três sinais anoméricos δ 5.28 ($^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$ 1,5Hz), δ 4.62 ($^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$ 7,5Hz), e δ 4.60 ($^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$ 7,5Hz); isto parece indicar um dissacarídeo com a extremidade redutora nas formas α e β .

O espectro de ^{13}C -RMN mostrou sinais com o mesmo deslocamento químico da galactopirranose livre em solução em mutarotação, em δ 92.146 e 96.158, respectivamente α e β anômeros; dois sinais em δ 104.297 e δ 104.254 com intensidades relativas semelhantes aos sinais de α e β redutores, correspondentes a metil-galactopiranosídeo. O sinal em δ 82.42 indica uma ligação em C-3, bem como o de δ 79.30 (observar que no oligo p85-b estes sinais não aparecem). O espectro de ^{13}C -DEPT135 que evidencia os carbonos

metilênicos (CH_2 -) mostrou dois conjuntos de sinais invertidos em δ 60.92, e δ 61.10, correspondendo aos C6 de ambas as galactoses do oligossacarídeo, definindo que o composto não possui uma substituição (1 \rightarrow 6), Figura 11.

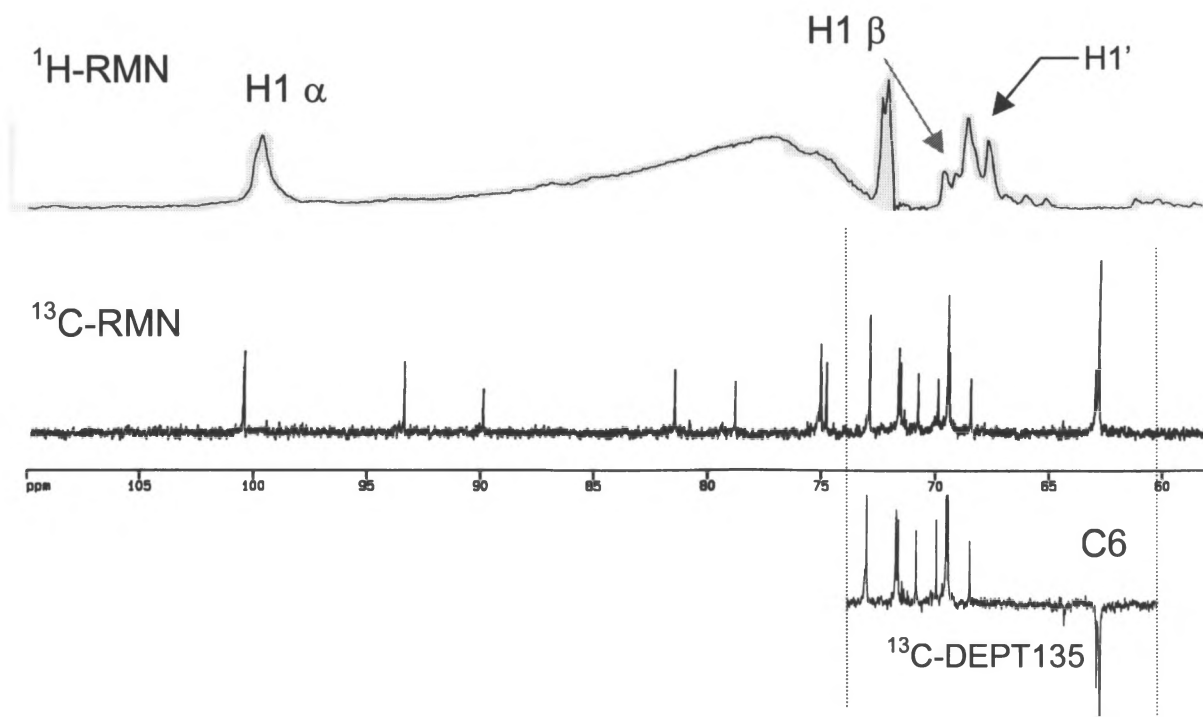


FIGURA 11: OLIGOSSACARÍDEO P85-A: AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE ^1H -RMN; ^{13}C -RMN AMPLIADO NA REGIÃO DE C1 A C6, INSERTO REFER-SE A REGIÃO DE CH_2 , SUBSTITUIDO OU NÃO, DO EXPERIMENTO DEPT135.

A partir dos prótons anoméricos, foram obtidos os deslocamentos químicos do prótons vicinais através do acoplamento existente e mostrado no experimento de COSY (Correlation Spectroscopy), onde o sinal δ 5.28 mostra um sinal de acoplamento com o sinal de δ 3.98, e assim sucessivamente até o sinal de acoplamento de H3 e H4 que não foi possível determinar por este experimento; o restante da determinação dos prótons foi por TOCSY (Total Correlation

Spectroscopy), que forneceu possíveis acoplamentos que somados aos dados de HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Spectroscopy), e comparados ao deslocamentos do metil-galactopiranosídeo, forneceu o assinalamento da Tabela 4.

TABELA 4: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS OBTIDOS A PARTIR DOS ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C DO OLIGOSSACARÍDEO P85-A, DE HIDRÓLISE PARCIAL DA GALACTANA DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *A. fulica*

	α -Galp (red.)		β -Galp (red.)		(1 \rightarrow 3)-Galp	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	5.28	92.16	4.63	96.18	4.61	104.32(α) 104.27(β)
2	3.98	67.45	3.67	71.13	3.63	71.07
3	3.99	79.34	3.79	82.42	3.65	72.55
4	4.26	69.12	3.72	74.72	3.93	68.58
5	4.19	68.55	-x-	-x-	3.70	75.03
6	3.74	61.10	3.74	60.92	3.74	60.92
6'	" "	61.10	" "	60.92	" "	60.92

O sinal no ^1H -RMN em δ 4.61 tem acoplamento no HMQC (figura 13) com o sinais de carbono em δ 104.32 e δ 104.27, figura 12, valores próximos aos do C1 do metil-galactopiranosídeo, definindo estes sinais como os de H1 e C1 da extremidade não redutora de galactopiranosídeo. O sinal de H1 da extremidade não redutora está correlacionado no espaço com os sinais de δ 3.79 e δ 3.98 que corresponde a H3 β e H3 α respectivamente, dados do experimento de ROESY (Rotating Frame Spectroscopy), onde os sinais de acoplamentos de elétron

compartilhado aparecem em negativo e os de acoplamentos no espaço em fase positiva.

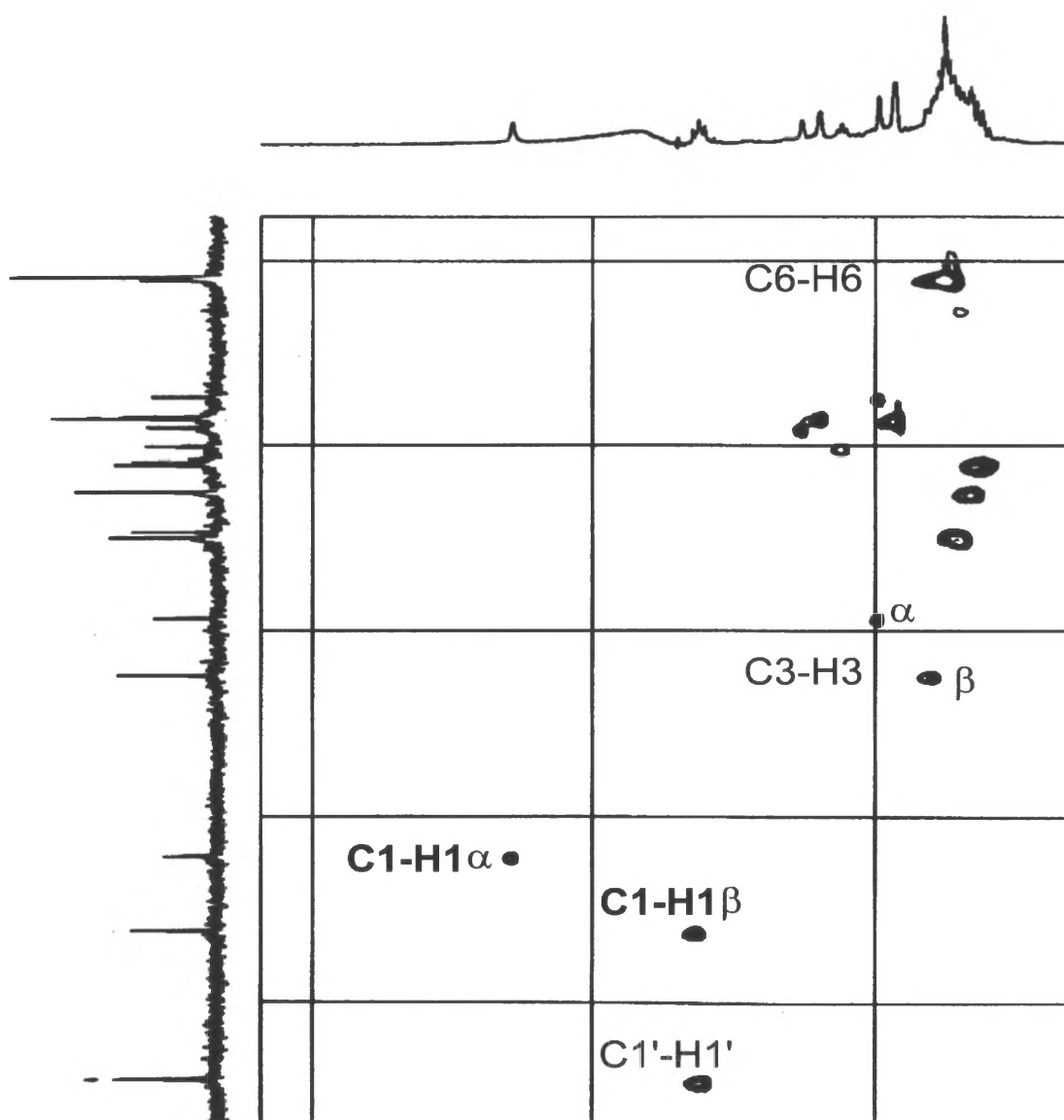


FIGURA 12: ESPECTRO DE HMQC DO OLIGO P85-A DA HIDRÓLISE PARCIAL DA GALACTANA DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *A. fulica*

Pode-se afirmar portanto que o oligossacarídeo p85-a corresponde a β -Galp (1 \rightarrow 3)- α , β -D-Galp.

Na figura 13, observa-se o experimento de ^1H -nmr e os resultados obtidos em secções monodimensionais (1D) dos espectros de 2D COSY, 2D TOCSY e 2D ROESY. No ^1H -RMN todos os hidrogênios da molécula são mostrados; no COSY, selecionado o H1' (próton anomérico da galactopiranosose não redutora), apenas o H2' se diferencia, e nenhum outro aparece; no TOCSY, selecionando-se da mesma forma o H-1', além do H-2', apenas o H-3' aparece, observar que outros prótons adiante, H-4' a H-6', não se evidenciam devido a pequena constante de acoplamento entre H-3' e H-4', característico para a galactose; no ROESY para o mesmo H-1' selecionado, o H-2' e H-3' aparecem para baixo da linha de base, ou, em fase negativa, já os prótons com fase positiva, são os de acoplamento no espaço, ou seja com maior intensidade, o H-3 de α e β .

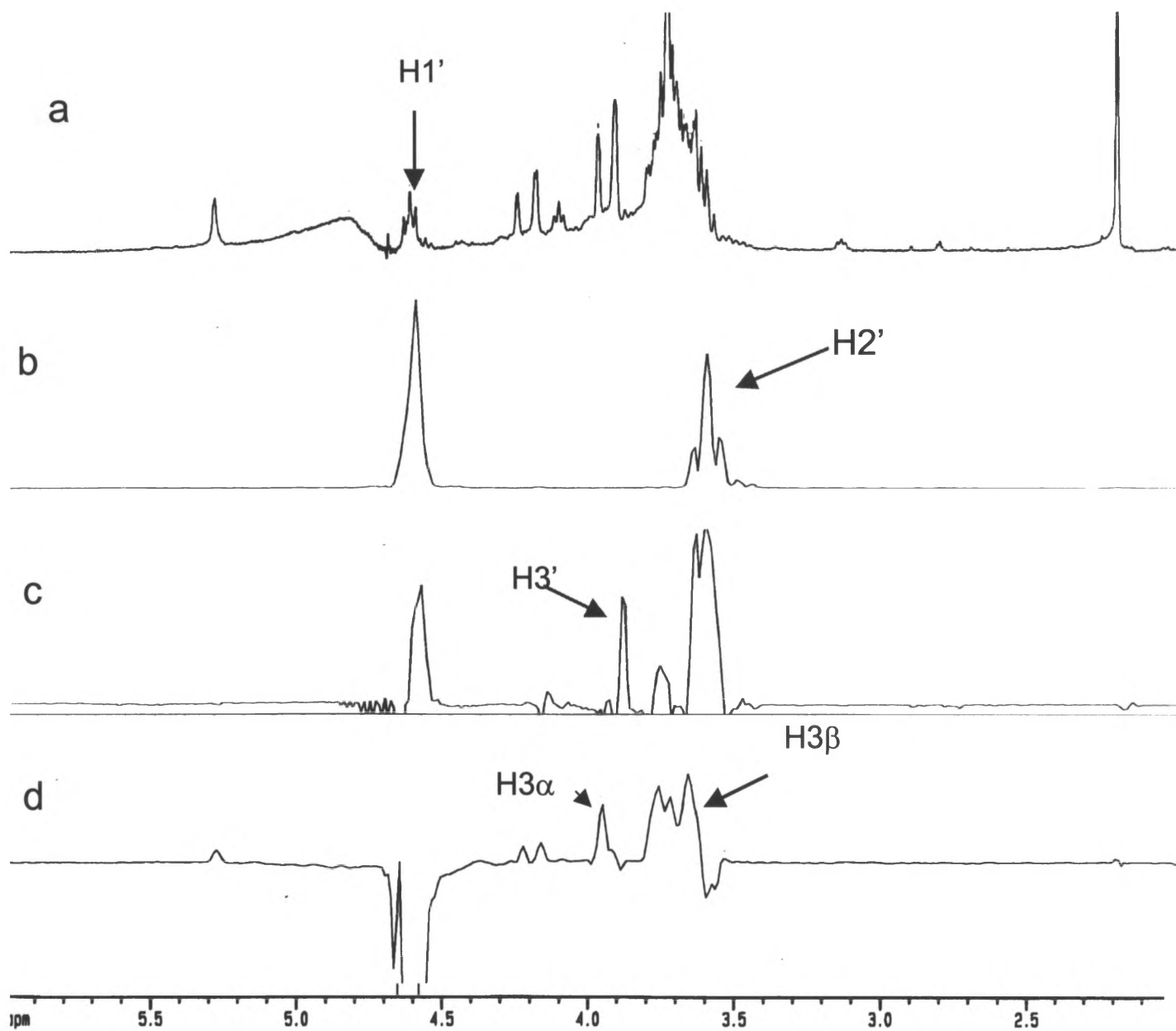


FIGURA 13: ESPECTRO DE (a) ^1H -RMN E SECÇÕES MONODIMENSIONAIS DOS ESPECTROS DE 2D (b) COSY, (c) TOCSY, e (d) ROESY DO OLIGOSSACARÍDEO P85-A

A fração p85-b foi identificada como oligossacarídeo correspondendo a β -D-Galp (1 \rightarrow 6)- α , β -D-Galp, identificado por comparação com o espectro de próton e ^{13}C -RMN do padrão desta substância e os assinalamentos produzidos por HMQC, e HMQC-DEPT constam da Tabela 5. A partir deste oligossacarídeo determinou-se os parâmetros de aquisição para o experimento HMQC-DEPT e a partir disto, o deslocamento químico do C-6 substituído da galactana original. Neste experimento é possível correlacionar prótons aos seus respectivos carbonos, mostrando em negativo (abaixo da linha de base do espectro) os acoplamentos relativos a CH, e em positivo os acoplamentos relativos ao CH₂ desacoplado.

TABELA 5: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS OBTIDOS A PARTIR DOS ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C DO OLIGOSSACARÍDEO P85-B, DE HIDRÓLISE PARCIAL DA GALACTANA DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *A. fulica*

	α -Galp (red.)		β -Galp (red.)		(1 \rightarrow 6)-Galp	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	5.11	92.3	4.44	96.4	4.29	103.2(α) 103.1(β)
2	3.78	68.8	3.35	71.8	3.38	70.8
3	3.71	69.3	3.75	73.7	3.50	72.7(a) 72.6(b)
4	3.90	69.2	3.7~	68.9	3.78	68.6
5	3.49	72.5	3.55	75.5	3.55	75.1
6	3.80	69.5	3.75	68.8	3.58	60.9

A fração denominada **p85-c** forneceu resultados de ^{13}C -RMN que indicam constituir de uma mistura de pelo menos dois oligossacarídeos, um deles provavelmente ligado em C3 e outro em C6, na região anomérica os deslocamento químicos são muito próximos aos do polissacarídeo original indicando a possibilidade de que se trate de dois trissacarídeos. O espectro de ^{13}C -RMN do componente denominado **p85-d** indica a presença de uma mistura, devido aos duplos picos na unidade de galactose redutora, e a sua determinação estrutural depende de uma técnica de purificação mais adequada para este fim, e que não foi realizada neste trabalho.

A identidade dos oligossacarídeos **p85-a** e **p85-b**, foram avaliadas e confirmadas por espectrometria de massa de spray eletrônico (ESI-MS), que forneceu massa de 341 m/z no modo negativo, correspondendo ao espectro esperado para dissacarídeos de hexoses.

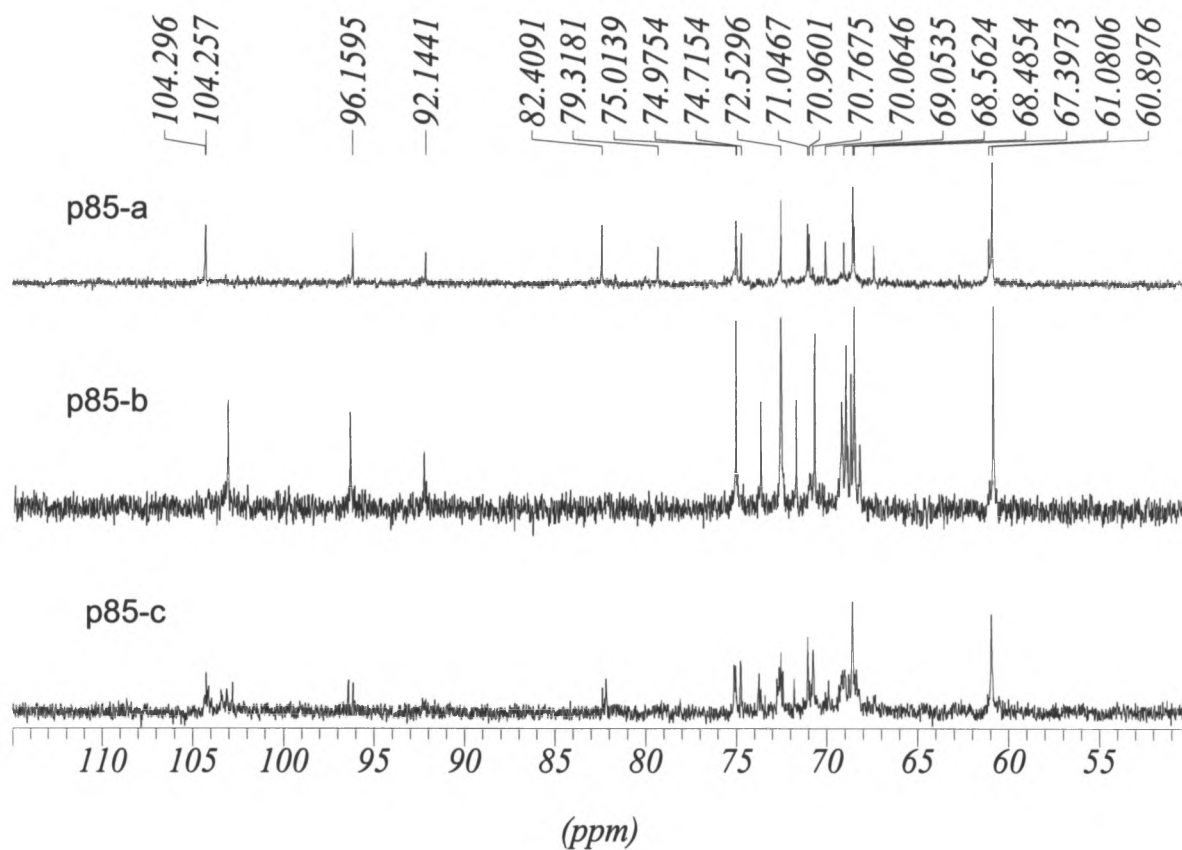
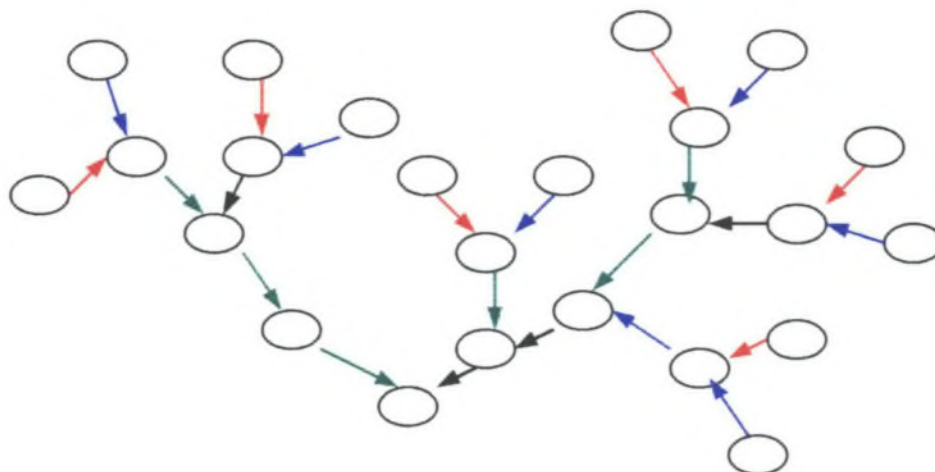


FIGURA 14: ESPECTROS DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDAS A PARTIR DO HIDROLISADO ÁCIDO DA GALACTANA DAS GLÂNDULAS DE ALBÚMEN DE *A. fulica*



5

Assim justificando o modelo proposto por O'Colla, para a galactana, representada na estrutura **5** (Corrêa *et al.*, 1964). A provável estrutura, é constituída de unidades de galactose dissubstituídas por ligações β -(1→3), e β -(1→6), n vezes, e por fim por, outra galactose terminal não redutora (Figura 3). Pequenas cadeias lineares são justificadas pelos resultados de metilação obtidos por outros autores para estas galactanas e da análise dos resíduos de degradações controladas e sequenciadas de Smith.

Na estrutura **5**, os círculos representam os anéis de D-galactopiranosose; as setas de diferentes cores representam o tipo de ligação relativa ao deslocamento químico aproximado dos carbonos anoméricos, assim, as setas em verde indicam ligações β -(1→3) entre unidades de cadeia linear de galactose, ou o carbono anomérico de unidades dissubstituídas; as setas pretas representam carbonos anoméricos de unidades ligadas a outra por ligação β -(1→6) e dissubstituídas em

C-3 e C-6; as setas vermelhas representam ligações β -(1 \rightarrow 3) de unidades terminais não redutoras, e as azuis, unidades terminais não redutoras ligadas em C-6.

Seguindo a mesma representação, é apresentado esquematicamente a constituição dos sinais anoméricos da galactana de glândula de albúmen de *A. fulica*, tal qual é obtido no espectro de ^{13}C -RMN. Onde a barra vertical em cor verde representa o C-1 de unidades de galactose ligadas entre si por ligações β -(1 \rightarrow 3), ou de unidades dissubstituídas em C-3 e C-6; a barra em vermelho representa os C-1 de unidades terminais não redutoras ligadas em C-3; a barra de cor preta representa o C-1 de unidades dissubstituídas ligadas (1 \rightarrow 6); e por fim, as barras em azul representam unidades nas extremidades não redutoras ligadas (1 \rightarrow 6).

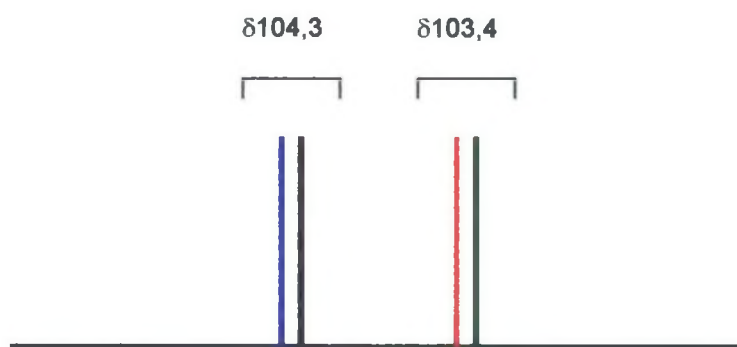


FIGURA 15: SIMULAÇÃO DO ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DO MODELO ARBORIFORME, REPRESENTADO PELA ESTRUTURA 5

O sinal em δ 103,2 é semelhante ao obtido para o padrão de β -D-Galactopiranosose-(1 \rightarrow 3)-Metil- β -D-galactopiranosídeo (Gorin, 1981), tanto de C-1 como de C-1' (δ 105,75, e δ 105,2, respectivamente, considerando um fator de correção de 2PPM a partir do sinal de C-3, δ 84,0 para o padrão e δ 82,1 para a

galactana), bem como levando a crer que este sinal possa corresponder ao C-1 da unidade dissubstituída.

A determinação dos sinais de C-1 para a unidade dissubstituída foi confirmada por degradações de Smith, utilizando periodato de sódio. Ao todo foram realizadas quatro degradações, que mostraram o aumento gradual do sinal das ligações (1→3) aferidas por ¹H-RMN, demonstrando uma evidência da cadeia linear (1→3) com δ 4,35 no espectro de próton, sobre as unidades terminais não redutoras em δ 4,55, semelhante ao observado para o derivado metil- β -D-galactopiranosídeo (Agrawal, 1992). Onde a relação entre o H-1 da unidade dissubstituída e o H-1 da unidade terminal não redutora começou com 1,1:1 para o polissacarídeo nativo, 1,14:1 após a primeira degradação, 1,45:1 com a Segunda, e 1,58:1 após a terceira degradação, Figura 16. Este resultado é compatível com os obtidos para galactanas de moluscos em geral (Bretting *et al.*, 1981). O deslocamento químico do C-1 da unidade dissubstituída, por HMQC, em δ 103.4, é semelhante ao encontrado para β -D-galactopiranosil-(1↔1)-glicerol (Machado, 1996).

As degradações sequenciadas de Smith realizadas sobre a galactana, foram concistentes com os resultados obtidos por metilação para esta estrutura isolada de outros moluscos (Bretting *et al.*, 1981), onde o percentual do derivado formado por análise de metilação 2,4,6-tri-O-metil-galactitol acetato aumenta, atingindo valor máximo de 70%, para o *B. glabrata* (Iacomini, 1981), e de 72% para *M. paranaguensis*.

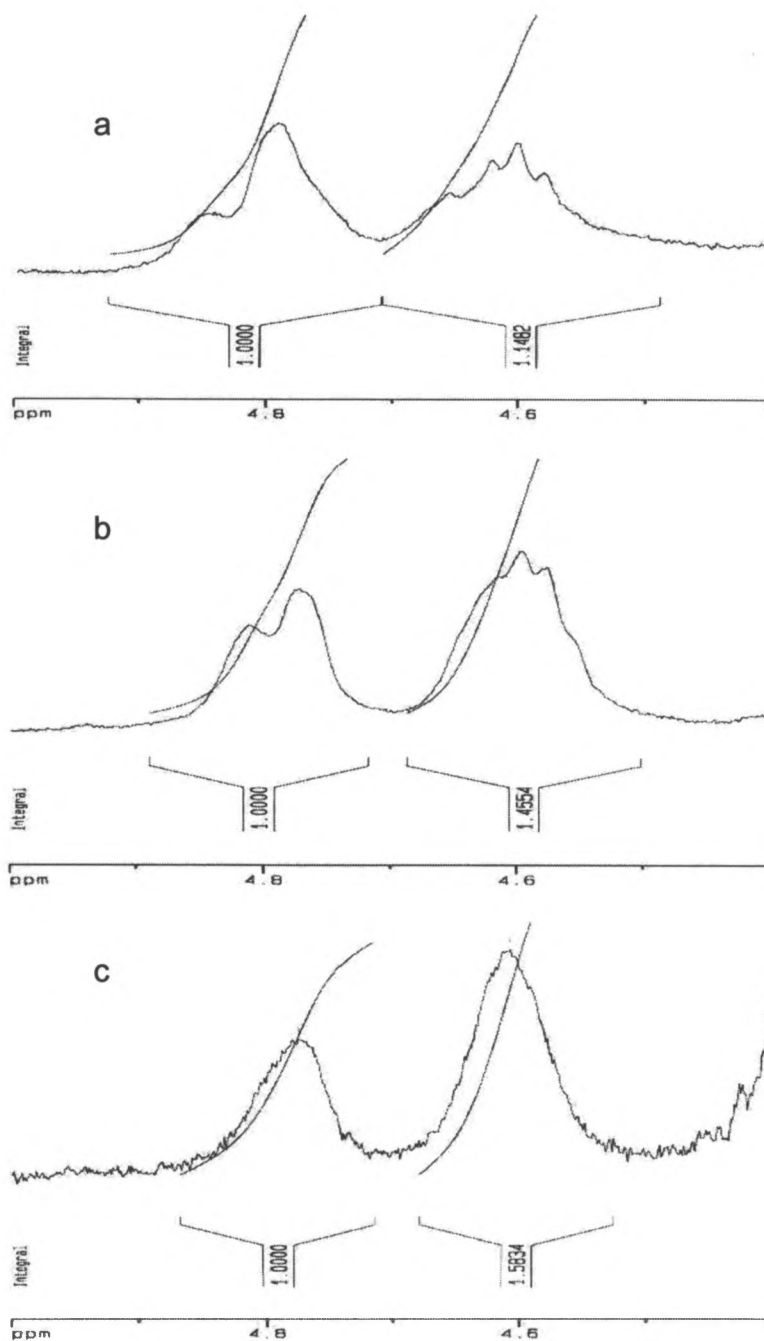


FIGURA 16: REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE $^1\text{H-RMN}$ DOS POLISSACARÍDEOS RESULTANTES DE DEGRADAÇÕES SEQUENCIADAS DE SMITH COM AS SUAS RELAÇÕES DE ÁREA RELATIVAS, ONDE (A) É O MATERIAL APÓS A 1^a DEGRADAÇÃO, (B) DA 2^a E (C) DA 3^a DEGRADAÇÃO.

de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, tanto no polissacarídeo nativo como no degradado, levando a crer que sejam polissacarídeos semelhantes.

O espectro de ^{13}C -RMN da galactana após a primeira degradação evidenciou sinais de menor intensidade com deslocamentos químicos ao redor de δ 103,4 e δ 104,3, o mesmo se repetindo para os sinais de δ 4,55 e δ 4,35, no espectro de ^1H -RMN estes sinais se confundem dentro dos acoplamentos, tornando sua identificação inviável por técnicas monodimensionais. No espectro de HMQC estes sinais entretanto se localizaram em dois grupos de acoplamento com δ 103,4 e δ 104,3. A determinação destes sinais foi possibilitada pelos dados dos oligossacarídeos de hidrólise parcial indicando os possíveis deslocamentos químicos dos sinais de C-1 para as unidades terminais não redutoras ligadas β -(1 \rightarrow 3) com δ 104,3 coincidente ao obtido para a extremidade redutora do oligo **p85-a**, bem como do padrão, e para C-1 da galactopiranosose ligada β -(1 \rightarrow 6) δ 103,4, do oligossacarídeo **p85-b**. Na Figura 17 b, observa-se o aumento do sinal na região de 103,6, se comparado ao sinal de 105,04, e o seu equivalente na Figura 16 a.

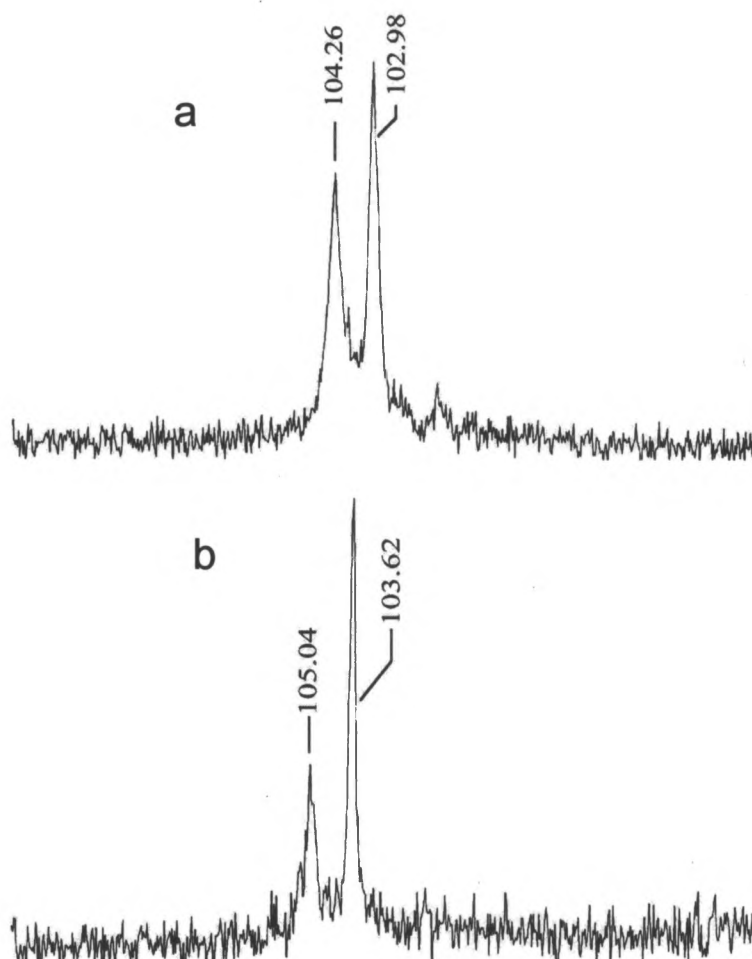


FIGURA 17: ESPECTROS DE ¹³C-RMN DA REGIÃO ANOMÉRICA DE (a) POLISSACARÍDEO ORIGINAL, (b) MATERIAL RESULTANTE DA TERCEIRA DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

Os dados de HMQC do polissacarídeo original forneceu o assinalamento parcial de prótons e carbonos da galactana, mostrados na Tabela 6, foi realizado com base nos deslocamentos químicos dos oligossacarídeos, a partir do espectro de HMQC do primeiro degradado, que forneceu espectro mais resolvido.

TABELA 6: ASSINALAMENTO PARCIAL DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DA GALACTANA DE GLANDULA DE ALBÚMEN DE *A. fulica*

	ext. não red.				Galp dissubstituída.	
	β -(1→3)		β -(1→6)		^1H	^{13}C
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	4.55	104.3	4.3~	103.4~	4.35	103.4
2	3.44	71.1	3.53	71.1	3.62	70.1
3	3.54	73.0	~ ^a	~ ^a	3.71	82.1
4	3.84	69.0	~ ^a	~ ^a	3.80	73.7
5	3.57	75.2	~ ^a	~ ^a	~ ^a	~ ^a
6	3.67	61.1	3.67	61.1	3.84	69.0

^a não foi possível precisar qual o sinal correspondente

O sinal de C-6 substituído com foi atribuído a partir do HMQC-DEPT do oligossacarídeo **p85-b**, com δ 68,8 para a unidade β - redutora. O sinal da substituição em C-3, determinado pelo sinal semelhante no oligossacarídeo **p85-a**, δ 82,4 , e δ 82,12 para a galactana.

6.2 Glicolípido isolado da glândula de albúmen do molusco *Achatina fulica*

O material proveniente da extração CHCl_3 :MeOH (2:1), item 5.2.1, foi submetido ao procedimento de Folch, segundo Machado (1996), e da fase lipídica eluída em coluna de sílica gel, obtido uma fração, com 3,4 mg e denominada **A1.AF**, que em CCD, correspondia ao padrão de monogalactosil-acilglicerídeo.

O espectro de HMQC, Figura 18, com acoplamentos entre prótons e seus respectivos carbonos mostrou um sinal de acoplamento com deslocamento químico no próton de δ 4,03 e no carbono de δ 104,9, que indicam uma ligação com a configuração em β -. Machado encontrou um mono-glucosilglicerídeo com o C-1 da glucose em δ 104,2, como contaminante junto a um mono-galactosilglicerídeo em δ 103,2, posteriormente isolado e identificado (Machado, 1996). Os resultados de CG-EM do material deacilado, hidrolisado e derivado como alditol acetato, indicaram que o monossacarídeo envolvido na ligação era glucose. O acoplamento entre o próton com deslocamento químico de δ 5.05 e carbono em δ 70,5, pode ser atribuído como C-2 do glicerol envolvido em glicoglicerolípídeos. Os sinais em δ 69,85 bem como de δ 63,46 indicam a possibilidade de C-1 e C-3 respectivamente, de 1-O- β -D-glucopiranosil-glicerol.

TABELA 7: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H E ^{13}C PARA O MONOGLUCOSIGLICERÍDEO ISOLADO DE GLÂNDULA DE ALBÚMEN DE *A. fulica*

Núcleo	^1H	^{13}C
1	4.026	104.9
2	3.46	71.8
3	3.94	73.6
4	3.68	69.5
5	3.82	73.6
6	3.94 4.10	63.5
1	3.66 3.79	69.8
2	5.05	70.5
3	3.94 4.10	63.5
-(CH ₂) _n -	1.02	23-32
-CH ₃	0.67	15.4

TABELA 8: COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDAS A PARTIR DOS SEUS ÉSTER METÁLICOS

	Material bruto	glicolípídeo
Mirístico	0.64	2.72
Palmítico	36.56	49.70
Estearico	37.08	-x-
Linoléico	14.62	-x-
Linolênico	3.8	-x-
Aracdônico	4.62	47.05
Lignocérico	2.55	-x-

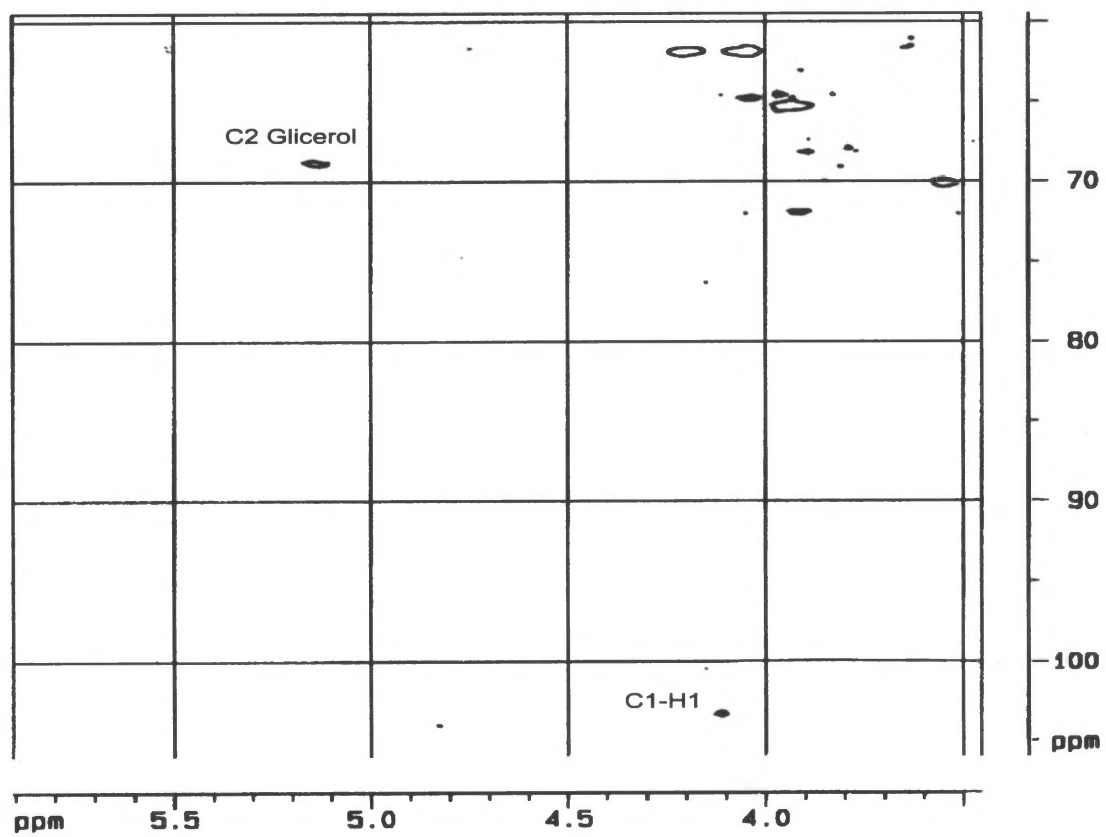


FIGURA 18: ESPECTRO DE HMQC DO GLICOLIPÍDIO A1, DE GLÂNDULA DE ALBUMEN DE *A. fulica*

Os assinalamentos para a fração carboidrato do glicolípido foram realizados a partir dos padrões de β -metil-glucopiranosose para ^1H -RMN (Agrawal, 1992) e ^{13}C -RMN (Gorin e Mazurek, 1975), e estão mostrados na Tabela 7.

A análise de CG-EM do material resultante da metanólise da fração **A1.AF** indicou que os principais ácidos graxos deste glicoglicerolípido são ácido palmítico (40%), e ácido aracdônico (38%). Os padrões de fragmentação para estes compostos reforçaram os dados do tempo de retenção (Machado 1996). O material bruto, antes do fracionamento por coluna, forneceu como composição de ácidos graxos totais por análise em CG-EM principalmente o ácido palmítico e olêico, com 36% e 37% respectivamente, os outros ácidos graxos presentes são ácido mirístico (0,6%), linoléico (14,6%), linolênico (3,8%), aracdônico (4,6%), e lignocérico (2,8%). A composição de ácidos graxos do glicolípido está na Tabela 8.

7 CONCLUSÕES

-Foi isolado da glândula de albúmen de *A. fulica* um polissacarídeo de galactose como sendo uma galactana com ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6), e que foi identificado por métodos espectroscópicos de 1D ^1H , e ^{13}C -RMN, e químicos como:

- hidrólise parcial da galactana de glândula de albúmen de *A. fulica* que produziu oligossacarídeos separados por cromatografia em papel, identificadas pelas técnicas analíticas disponíveis como sendo β -Galp (1 \rightarrow 3)- α , β -Galp, β -Galp (1 \rightarrow 6)- α , β -Galp

- degradação sequenciada de Smith.

- Foi isolado da fração lipídica um composto que pelos pelos métodos analíticos disponíveis, foi identificado como um 1-O- β -D-glucoglicerolípídeo, acilado, principalmente pelos ácidos graxos palmítico e aracdônico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. A. Chromatography on paper. *Methods, Carbohydr. Chem.*, v. 1, p. 21-31, 1962
- AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry(OXF)*, Oxford, v.31, n.10, p. 3307-3330, 1992)
- ASPINAL, G. O. *The Polysaccharides*, v. I, Acad. Press., USA, p. 37-80, 1982
- BALDWIN, E e BELL, D. J. A preliminary investigation of galactogen isolated from the whole bodies of snails. *J.Chem Soc.*, London, p. 1461-1465, 1938.
- BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A J.. Structural chemistry of polisaccharides from fungi and lichens. *Adv. Carbohydr. Chem. Bioch.*, San Diego, v.41, p. 68-101, 1983
- BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A. J. e TRAVASSOS, L. R. Cell constituents of mycelia and conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 95, p. 205, 1981
- BARRETO-BERGTER, E.; TRAVASSOS, L. R.; GORIN, P. A. J. Chemical structure of the D-galacto-D-manna component from hyphae of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* spp. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 86, p. 273,

1980

BARRY, V. C. Regulated degradation of 1,3 polysaccharides. *Nature*, London, v. 152, p. 537-538, 1943

BAX, A. e SUBRAMANIAN, S. *J. Magn. Reson.*, 67, p. 565, 1986

BAX, A. e DAVIS, D. G. *J. Magn. Reson.*, 65, p. 355, 1985

BAX, A.; GRIFFEY, R. H. e HAWKINS, B. L. *J. Magn. Reson.*, 55, p. 301, 1983

BELL, D. J. e BALDWIN, E. The chemistry of galactogen from the albumen glands of *Helix pomatia*. *J. Chem. Soc.*, London, p. 125-131, 1941.

BENSON, A. A. The plant sulfolipid. *Adv. Lip. Res.*, San Diego, v. 1, p. 387-394, 1963

BERNSTEIN, M. A. e HALL, L. D. Denovo sequencing of oligosaccharides by proton nmr spectroscopy. *J. Amer. Chem. Soc.*, Washington. 104, p. 5553-5555, 1982

BERNSTEIN, M. A., **Chemical and Spectroscopic Studies of Complex Organic Molecules**. British Columbia, 1993. Tese (para graduação como Doctor of Philosophy), University of British Columbia

BORGES, E. A. Estudo estrutural sobre galactano ácido isolado da glândula de albúmen de *Ampullarius* sp. (Sto Antônio da Platina). Curitiba, 1977. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná)

- BOTHNER, A. A.; STEPHENS, R. L.; LEE, J. M.; WARREN, C.D., e JEANLOZ, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 811-813, 1984
- BREITMAIER, E. e VOELTER, W. Carbon-13 NMR Spectroscopy. VCH, New York, 1990, p. 379-397
- BRETTING, H.; JACOBS, G.; BENECKE, J.; KÖNIG, W. A., e THIEM, J. E., The occurrence of L-galactose in Snail Galactan. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 139, p. 225-236, 1985
- BRETTING, H.; JACOBS, G.; THIEM, J. E.; KÖNIG, W. A., e VAN DER KNAAP, W. Structural investigations of the galactan of the snail *Lymnaea stagnalis*. *Carbohydr. Res.*, 145, p. 201-218, 1986
- CAPELLA, P.; GALLI, C. e FUNAGALLI *Lipids*, 3, p. 431-438, 1968
- CARTER, H. E. e GAVER, R. C. *J. Lip. Res.*, 8, p. 391-395, 1967
- CARTER, H. E.; JOHNSON, P. e WEBER, E. J. Glycolipids, *Ann. Ver. Biochem.*, Palo Alto, 34, p. 109-142, 1965
- CAVANAGH, J. *et al.*, Protein NMR Spectroscopy. Academic Press Inc., USA, 1996, p. 302-305
- CHESTER, M. A. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN): Nomenclature of Glycolipids, *Eur. J. Biochem.*, 257, p. 293-298, 1998

CIUCANU, I.; KEREK, F. *Carbohydr. Res.* 31, p. 209-217, 1984

COLSON, P.; JENNINGS, H. J. e SMITH, I. C. P. Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *J. Amer. Chem. Soc.*, Washington, v. 96(26), p. 8081-8087, 1974

CORREA, J. B. C., DMYTRACZENKO, A. e DUARTE, J. H. Structure of a galactan found in albumen glands of *Biomphalaria glabrata*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 3, p. 445-452, 1967

COSTELLO, A. J. R.; SLONEK, T.; SLODKI, M. E. e SEYMOR, F. R. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy of extracellular, yeast O-phosphono hexoglycans. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 42, p. 23-37, 1975

CRITCHLEY, D.R.; GRAHAM, J.M. e MACPHERSON. L. Subcellular distribution of glycolipids in a hamster cell line. *FEBS Lett.* 32, p. 37-40, 1973

DABROWSKY, J.; HANFLAND, P. e EGGE, H. Analysis of glycosphingolipids by high resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol.*, San Diego, V, p. 69-86, 1982

DODRELL, D. M.; PEGG, D. T. e BENDALL, M. R. *J. Magn. Res.*, 48, p. 323, 1982

DUARTE, J. H. e JONES, J. K. N. Some structural studies of the polysaccharides resulting from sequential Smith degradations of the galactan from the snail

- Strophocheilus oblongus*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 16, p. 327-335, 1971
- EVANS, J. N. S. *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, New York, 1996, p. 381-386
- FEIJÓ, M. A. L. e DUARTE, J. H. Some structural studies on fucogalactan from egg masses of the snail *Ampullarius* sp. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 44, p. 241-249, 1975
- FISHMANN, P. H. e BRADY, R. O. Biosynthesis and function of gangliosides *Science*, Washington, v. 194, p. 906-915, 1976
- FLEITZ, H. e HORSTMANN, H. J. On native galactogen from the egg of the pond snail *Lymnaea stagnalis* *Z. Physiol. Chem.*, v. 348, 1301-1306, 1967
- FOLCH, J; LEES, M., e STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 226, p. 497-509, 1957
- FONTANA, J. D.; DUARTE, J. H.; GALLO, M.; IACOMINI, M., e GORIN, P. A. J. Occurrence of β -D-galactopyranosyl units esterified at OH-6 with 2-aminoethylphosphonic acid in the albumen glands of the snail *Megalobulimus paranaguensis*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 143, p. 175-184, 1985.
- FRENCH, D. e WILD, G. M. Correlation of carbohydrate structure with papergram mobility. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v. 75, p. 2612-2616, 1953

- FRENCH, D.; ROBYT, J. F.; WEINTRAUB, M. e KNOCK, P. Separation of maltodextrins by charcoal chromatography. *J. Chromatog.*, 24, p. 68-75, 1966
- GORIN, P. A. J. e DUARTE, J. H. Snail polysaccharides. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v. 26(1), p. 35-49, 1983
- GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polisaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, San Diego, v. 38, p. 13-104, 1981
- GORIN, P. A. J. In: SANFORD, P. A. e MATSUO, K. (eds.), Fungal Polysaccharides. ACS Symp. Hawaii, series 26, p. 159-182, 1979.
- GORIN, P. A. J. e MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Can. J. Chem.*, Ottawa, v. 53, p. 1212-1222, 1975
- GORIN, P. A. J. e SPENCER, J. F. T. Proton magnetic resonance spectroscopy - na aid in identification and classification of yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 13, p. 25-89, 1970.
- GOUDSMIT, E.M. e ASHWELL, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, p. 417-22, 1965
- GOUDSMIT, em FLORKIN M. e SCHEER, B. T. (Eds.), *Chemical Zoology VII Mollusca*, Academic Press, New York, 1972
- HAMILTON, J. A. in Carbon-13 NMR Spectroscopy of Biological Systems

Academic Press, Sand Diego, USA, 1995, p 117

HAMMERSTEN, O. Studien über mucin und mucinähnliche substanz. *Pflügeros Arch. Physiol.*, 36, p. 373-455, 1885

HAWORTH, W. N. The constitution of the disacharides . Part II. Lactose and melibiose. *J. Chem Soc.*, 107, p. 189-199, 1915

HELLERQVIST, C. G.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S; HOLME, T. e LINDBERG, A. A. Structural studies on the O-specific side chains of the cell-wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* 395 MS. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 8, p. 43, 1968

HONDA, K. N. e DUARTE, J. H. Estudo estrutural dos oligosaccharideos obtidos por hidrolise ácida parcial do galactano isolado de glândula de albúmen de *Megalobulimus paranaguensis*. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v. 21, p. 97-118, 1978

HUGHES, R. C. e SHARON, N. Carbohydrates recognised. *Nature*, London, v. 274, p. 637-638, 1978

IACOMINI, M.; DUARTE, G. R.; DUARTE, E. R.; DUARTE, H. S.; FONTANA, J. D. e DUARTE, J. H. Structural study on snail galactans from the genus *Biomphalaria*. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 45, p. 1371-1380, 1981

IACOMINI, M.; DUARTE, H. S.; FEIJÓ, M. A. L.; MORETTO, M. I., e DUARTE, J. H. Structural studies on glycerol-glycosides resulting from sequential Smith-degradations of the galactan from *Megalobulimus paranaguensis*. *Arq. Biol.*

Tecnol., Curitiba, v. 23, p. 83-92, 1980

IACOMINI, M.; PETIZ, C. A. T.; MORETO, M. I.; DUARTE, H. S.; FEIJÓ, M. A. L. e DUARTE, J. H. Structural Features of the Galactan from eggs of the Snail *Megalobulimus paranaguensis*. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v. 22, p. 191-196, 1979

INAGAKI, F. *Magn. Reson. Chem.*, Special Issue, 30, S125-S133, 1992

IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN): Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans, Recommendation 1985, *Eur. J. Biochem.*, 159, p. 1-6, 1986

JENNINGS, H. J. e SMITH, I. C. P. Determination of the composition and Sequence of a Glucan Containing Mixed Linkages by Carbon Nuclear Magnetic Resonance, *J. Amer. Chem. Soc.*, Washington, v. 95(2), p. 606-608, 1973

JONES, C. NMR studies of phosphoinositol oligosaccharides from protozoa. *Ciência e Cultura(São Paulo)*, São Paulo, v. 46(4), p. 262-272, 1994

JOZIASSE, D. H.; DAMEN, H. C.; DE JONG-BRINK, M.; EDZES, H. T. e VAN DEN EIJNDEM, D. H. Identification of a UDP-Gal:β-galactoside β-1→3-galactosyltransferase in the Albumen Gland of the Snail *Lymnea stagnalis*, *FEBS Lett*, 221(1), p. 139-144, 1987

KARLSSON, K.A. e MARTENSSON, E. Studies on sphingosines. 13. The existence of phytosphingosine in bovine kidney sphingomyelins. *Biochim.*

- Biophys. Acta.*, Amsterdam, 152, p. 230-233, 1968
- KARLSSON, K.A., in: S. ABRAHAMSSON e I. PASCHER (Eds.), Structure of Biological Membranes, Plenum Press, New York, 1977, p. 245-274)
- KESSLER, H.; SCHMIEDER, P. e KURZ, M. *J. Magn. Resson.*, 85, p. 400-405, 1989
- KLENK; H.D. e CHOPPIN, P. W. Glycosphingolipids of plasma membranes of cultured cells and an enveloped virus (SV5) grown in these cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 66, p. 57-64, 1970
- KOCHETKOV, N. K. e SMIRNOVA, G. Glycolipids of marine invertebrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Bioch.*, San Diego, v. 44, p. 387-438, 1986
- KOSCIELAK, J.; MILLER-PODRAZA, H. e YU, R. K. Isolation of poly (glycosil) ceramides with A, B, H and I blood group activities. *Methods Enzymol.*, San Diego, v. L, p. 211-216, 1978.
- KUHN, R; TRISCHMANN e H; LÖW, I. *Angew. Chem.*, v. 67(1), p. 32, 1955
- LACHNER, E. A., C. R. ROBINS, e W. R. COURTENAY, Jr. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 59, p. 1-29, 1970
- LAINE, R. A. Glicoconjugates: Overview and Strategy. *Methods Enzimol.*, 193, p. 539-553, 1990
- LERNER, L e BAX, A. *J. Magn. Resson.*, 69, p. 375-380, 1986

- LÜTTGE, H; HEIDELBERG, T.; STANGIER, K.; THIEM, J. e BRETTING, H. The specificity of an alpha-(1→2)-L-galactosyltransferase from albumen glands of the snail *Helix pomatia*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 297, p. 281-288, 1997
- MACHADO, M. J. Isolamento e Análise Estrutural de Glicolípídeos de *Ramalina celastri* Curitiba, 1996. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Paraná)
- MAKITA, A. e YAMAKAWA, T. *J. Biochem.* (Tokyo), 61, p. 124-133, 1962
- MAY, F. Über dan galactogengehalt der Eier von *Helix pomatia*. *Z. Biol.*, v. 92, p. 319-324, 1932
- MAY, F. e WEINLAND, H. The acid hydrolysis of galactogen. I. Preferential cleavage of L-galactose in relation to D-galactose. *Z. Physiol. Chem.*, v. 305, p. 75-86, 1956
- MENDOÇA-PREVIATO, L; GORIN., P. A. J.; BRAGA, A.F.; SCHARFSTEIN, J. e PREVIATO, J. O. Chemical structures and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry*, Washington, v.22, p.4981-4987, 1984
- MORETO, M. I., IACOMINI, M.; FEIJÓ, M. A. L. e DUARTE, J. H. Sequential Smith degradation on the galactan from the albumen glands of the snail *Megalobulimus paranaguensis*. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v. 22, p. 46-54,

1979

MORRIS, G. A. e FREEMAN, R. Enhancement of nuclear magnetic resonance signal by polarization transfer *J. Am. Chem. Soc.*, 101, p. 760, 1979

NAGAYAMA, K.; KUMAR, A.; WÜTRICH, K. e ERNST, R. R. *J. Magn. Reson.*, 40, p. 321, 1980

O'COLLA, P. The application of the Barry degradation to snail galactogen. *Proc. R.I. A. Sect. B.*, 55, p. 165-170, 1953

OPELLA, S. J. NMR and membrane proteins. *Nature Struct. Biol.* 4, p. 845-848, 1997

PERLIN, A. S.; CASU, B., e KOCH, H. J. *Can. J. Chem.* 48, p. 2599, 1970

PETIZ, C. A. T. Degradação sequenciada tipo Smith em galactana de massa de ovos de *Ampullarius* sp. (Recife, PE). Curitiba, 1977. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná)

ROESSLER, M. A., G. L. BEARDSLEY, e D. C. TABB.. *Florida Scientist* 40, p. 87-94, 1977

SCHLUBACH, H. H., LOOP, W. e SCHMIDT, H. Methylation of galactogen isolated from the whole bodies of snails. *Annalen.*, 532, p 228-235, 1937.

SEGURA, E. A. D. e DUARTE, J. H. Methylation studies of the polysaccharides resulting from Smith-degradations of the galactan from the snail *Strophocheilus*

- oblongus, *Carbohydr. Res.*, 52, p. 159-167, 1976
- SLONECKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. *Methods. Carbohydr. Chem.*, 6, p. 20-24, 1972
- STANGIER, K.; LUTTGE, H.; THIEM, J.E. E BRETTING, H., Biosynthesis of the storage polysaccharide from the snail *Biomphalaria glabrata*, identification and specificity of a branching beta-(1→6) galactosyltransferase. *J. Comp. Physiol.[B]*, v. 165(4), 278-90, 1995
- TELES, H. M.; VAZ, J. F.; FONTES, L. R. e DOMINGOS, M. de F. Occurrence of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) in Brazil: intermediate snail host of angiostrongyliasis. *Rev. Saúde Pública*, 31(3), p. 310-312, 1997
- TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P. e HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, London, v. 165(4219), p. 444, 1950
- van HALBEEK, H. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbohydrate chains glycoproteins. *Methods Enzymol.*, v. 230, p. 132-168, 1994
- VLIEGENTHART, J. F. G.; DORLAND, L. e HALBEEK, H. *Adv. Carboihyd. Chem.*, v. 41, 1983, p. 209-373
- WAGNER. G. An account of NMR in structural biology. *Nature Struct. Biol.*, London, v. 4, p. 841-844, 1997
- WEINLAND, H e NUCHTERLEIN, K. Catabolism of galactogens by water-soluble enzymes of molds. *Hoppe-Sreyler's Z. Physiol. Chem.*, v. 298, p 48-54, 1954

WEINLAND, H. Z. Beobachtungen bei der sauerhydrolyse des galactogens. II. Mitteil. Isolierung und nachweis der aufgetrennten disaccharide 3- β -D-galaktose und 6- β -D-galaktoside-D-galaktose und 6- β -D-galaktoside mit spuren 6- β -L-galaktose. *Physiol. Chem.*, v. 305, p. 87-96, 1956