

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

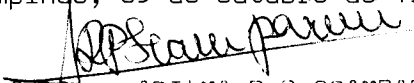
**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESTRUTURA
QUÍMICA DO EXOPOLISSACARÍDEO PS-32
OBTIDO A PARTIR DE FERMENTAÇÃO
AERÓBICA DA BACTÉRIA BEIJERINCKIA SP.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por DANIELA MARTINS MARIUZZO e aprovada pela Comissão Julgadora em 09.10.96.

DANIELA MARTINS MARIUZZO
Engenheira de Alimentos

Campinas, 09 de outubro de 1996


Profa. Dra. ADILMA R.P. SCAMPARINI

Presidente da Banca

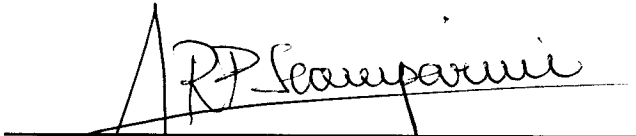
Prof^a Dr^a ADILMA REGINA PIPPA SCAMPARINI
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP,
para a obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS, 1996.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

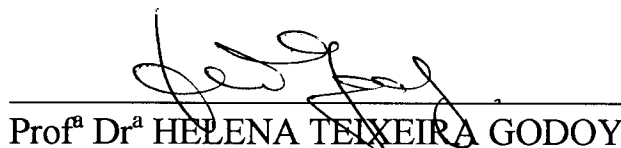
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª ADILMA REGINA PIPPA SCAMPARINI



Profª Drª CRISTINA TRISTÃO DE ANDRADE



Profª Drª HELENA TEIXEIRA GODOY

Profª Drª HELOÍSA MÁSCIA CECCHI

Campinas, ____ de _____ de 1996.

A Antonio José, Luceli,
Graziela e Flávio,
pelo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Professora Adilma Scamparini, minha orientadora, que sempre esteve comigo em todos os passos difíceis deste trabalho.

Ao Diretor desta Faculdade, Professor José Luís Pereira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela Bolsa de Mestrado.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões apresentadas na redação do trabalho.

Aos Professores: Gláucia Maria Pastore, Hélia Harumi Sato, José Roberto Trigo, Paulo Anna Bobbio e Florinda Orsati Bobbio, pela atenção e presteza.

À Professora Claire Tondo Vendruscolo pelo incentivo e auxílio.

Ao professor Cyril Pàrkàni, da Universidade da Flórida, EUA, por fornecer os espectros de RMN.

Ao meu amigo Ronaldo Jacobusi pela ajuda inestimável.

À aluna Heloísa Fujihara pelo trabalho em conjunto.

À Raquel Oriani pelas descobertas em conjunto.

À Helena Machado e João Tosello por estarem sempre às ordens.

Ao pessoal da Sinc, em especial, Ana Cristina Piza.

Ao pessoal do Laboratório Geral da Ciência.

E a todas as pessoas que de alguma forma tornaram este trabalho possível de se realizar.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	v
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1. Análise de Carboidratos por Cromatografia Gás-Líquida e Espectrometria de Massa.....	03
2.1.1. Derivação de Polissacarídeos para Análise em CGL.....	03
2.1.2. Espectrometria de Massa de Compostos Derivados de Açúcares.....	08
2.1.2.1. Características dos Espectros de Massa dos Derivados de Hexopiranoses Unidas por Ligações Glicosídicas.....	10
2.1.2.2. Características dos Espectros de Massa dos Derivados de Desoxi-hexoses Unidas por Ligações Glicosídicas.....	11
2.2. Análise da Estrutura Química de Polissacarídeos por Oxidação com Periodato.....	12
2.3. Análise de Carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	13
2.4. Análise de Carboidratos por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Material.....	19
3.1.1. Material Permanente.....	19
3.1.2. Material de Consumo.....	20
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Produção do Polissacarídeo PS-32.....	20
3.2.2. Testes Preliminares.....	22
3.2.2.1. Teste de Biureto.....	22

3.2.2.2. Determinação da presença de açúcares redutores (Prova de Fehling).....	22
3.2.2.3. Purificação enzimática do polissacarídeo PS-32.....	22
3.2.2.4. Umidade.....	23
3.2.2.5. Cinzas.....	23
3.2.2.6. Determinação da presença de ácidos urônicos.....	23
3.2.2.7. Determinação da presença de piruvato.....	23
3.2.2.8. Determinação da presença de grupos acetila.....	23
3.3. Estudos relacionados à identificação e quantificação dos monossacarídeos componentes do polissacarídeo PS-32.....	24
3.3.1. Hidrólise total do polissacarídeo PS-32 em meio ácido.....	24
3.3.1.1. Hidrólise com ácido clorídrico.....	24
3.3.1.2. Hidrólise com ácido trifluoroacético.....	24
3.3.2. Identificação dos produtos da hidrólise total do polissacarídeo PS-32.....	25
3.3.2.1. Identificação dos açúcares neutros por cromatografia descendente em papel.....	25
3.3.2.2. Identificação e quantificação dos açúcares neutros por cromatografia líquida de alta eficiência.....	25
3.4. Determinação das posições das ligações glicosídicas dos monossacarídeos constituintes do polissacarídeo PS-32.....	26
3.4.1. Oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio.....	26
3.4.1.1. Identificação dos produtos do polissacarídeo PS-32 oxidado, reduzido e hidrolisado.....	26
3.4.1.1.1. Identificação dos aldeídos por cromatografia em camada delgada.....	26
3.4.1.1.2. Identificação dos polióis por cromatografia descendente em papel.....	26
3.4.1.1.3. Identificação dos polióis por cromatografia gás - líquida acoplada a espectrometria de massa.....	27
3.4.1.2. Dosagem do ácido fórmico produzido pela oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio.....	27
3.4.2. Metilação do polissacarídeo PS-32.....	27
3.4.2.1. Preparo do íon dimetil Na.....	28
3.4.2.2. Processo de metilação do polissacarídeo PS-32.....	28
3.4.2.3. Hidrólise do polissacarídeo PS-32 metilado.....	28
3.4.2.4. Redução dos açúcares parcialmente metilados.....	28

3.4.2.5. Acetilação dos alditóis parcialmente metilados.....	29
3.4.3. Análise dos alditóis acetilados parcialmente metilados, por cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa.....	29
3.5. Análise do polissacarídeo PS-32 por espectrometria na região do infravermelho.....	29
3.6. Análise do polissacarídeo PS-32 por espectrometria de ressonância nuclear magnética de ^1H e de ^{13}C	30
3.6.1. Preparo da amostra do polissacarídeo PS-32 para análises em RMN de ^1H e de ^{13}C	30
3.6.2. Análise em RMN de ^1H e de ^{13}C	30
3.7. Determinação do desvio do sentido da luz polarizada do polissacarídeo PS-32.....	30
4.RESULTADOS.....	31
4.1. Testes Preliminares.....	31
4.1.1. Presença de proteínas.....	31
4.1.2. Presença de açúcares redutores.....	31
4.1.3. Outros testes.....	31
4.2. Determinação e quantificação dos monossacarídeos componentes do polissacarídeo PS-32 por CLAE	32
4.3. Determinação das posições das ligações glicosídicas dos monossacarídeos constituintes do polissacarídeo PS-32.....	32
4.3.1. Resultados da oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio.....	32
4.3.1.1. Identificação dos produtos do polissacarídeo PS-32 oxidado, reduzido e hidrolisado.....	33
4.3.1.1.1. Identificação dos aldeídos por cromatografia em camada delgada.....	33
4.3.1.1.2. Identificação dos polióis por cromatografia descendente em papel.....	33
4.3.1.1.3. Identificação dos polióis por cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa.....	33
4.3.1.1.4. Identificação dos monossacarídeos recuperados na oxidação com periodato de sódio.....	34
4.3.1.2. Dosagem do ácido fórmico produzido pela oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio.....	34

4.3.2. Análise dos alditóis acetilados parcialmente metilados para localização das ligações glicosídicas dos resíduos do polissacarídeo PS-32 por cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa.....	34
4.3.2.1. Interpretação dos espectros de massa.....	36
4.3.2.1.1. Fucose com ligações nas hidroxilas dos C1 e C4.....	36
4.3.2.1.2. Glucose terminal com ligação na hidroxila do C1.....	37
4.3.2.1.3. Glucose com ligações nas hidroxilas dos C1 e C4.....	37
4.3.2.1.4. Galactose com ligações nas hidroxilas dos C1, C4 e C6.....	38
4.4. Análise do polissacarídeo PS-32 por espectrometria na região do infravermelho.....	38
4.5. Análise do polissacarídeo PS-32 por espectrometria de ressonância nuclear magnética de ^1H e de ^{13}C	39
4.5.1. Ressonância nuclear magnética de ^1H	39
4.5.2. Ressonância nuclear magnética de ^{13}C	39
4.6. Determinação do desvio do sentido da luz polarizada.....	39
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	40
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Espectro de massa do 1,2,5,-tri-O-acetil-(1-deutério)-3,4,6-tri-O-metil hexitol.....	44
Figura 2- Espectro de massa do 1,3,5,-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,4,6-tri-O-metil hexitol.....	45
Figura 3- Espectro de massa do 1,4,5,-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,3,6-tri-O-metil hexitol.....	46
Figura 4- Espectro de massa do 1,5,6-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,3,4-tri-O-metil hexitol.....	47
Figura 5- Espectro de massa do 1,2,3,5-tetra-O-acetil-(1-deutério)-4,6-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada.....	48
Figura 6- Espectro de massa do 1,2,4,5-tetra-O-acetil-(1-deutério)-3,6-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada.....	49
Figura 7- Espectro de massa do 1,2,5,6-tetra-O-acetil-(1-deutério)-3,4-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada.....	50
Figura 8- Espectro de massa do 1,3,4,5-tetra-O-acetil-(1-deutério)-2,6-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada.....	51
Figura 9- Espectro de massa do 1,3,5,6-tetra-O-acetil-(1-deutério)-2,4-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada.....	52
Figura 10- Espectro de massa do 1,4,5,6-tetra-O-acetil-(1-deutério)-2,3-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada.....	53
Figura 11- Espectro de massa do 1,2,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-3,4-di-O-metil desoxi-hexitol.....	54

Figura 12- Espectro de massa do 1,3,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,4-di-O-metil desoxi-hexitol.....	55
Figura 13- Espectro de massa do 1,4,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,3-di-O-metil desoxi-hexitol.....	56
Figura 14- Espectro de massa do 1,2,4,5-tetra-O-acetil-(1-deutério)-3-O-metil desoxi-hexitol.....	57
Figura 15- Oxidação de carboidratos com periodato.....	58
Figura 16- Cromatograma obtido por CLAE dos produtos de hidrólise do polissacarídeo PS-32 com TFA 2N, por 16 horas a 100°C, utilizado para quantificação dos açúcares glucose, galactose e fucose. Os açúcares foram quantificados na relação de 3:1:3, glucose, galactose e fucose, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna de troca iônica SCR-101P, temperatura da coluna 80°C, fase móvel água ultrapura, fluxo de 0,6 mL/min.....	59
Figura 17- Curvas de Calibração utilizadas para quantificação dos açúcares constituintes do polissacarídeo PS-32.....	60
Continuação da Figura 17.....	61
Figura 18- Cromatograma dos açúcares padrões (C=5000 ppm) usados na construção das Curvas de Calibração. Condições cromatográficas: coluna de troca iônica SCR-101P, temperatura da coluna 80°C, fase móvel água ultrapura, fluxo de 0,6 mL/min.....	62
Figura 19- Cromatograma obtido por CGL dos polióis obtidos após oxidação, redução, hidrólise e silanização do polissacarídeo PS-32. Pico 1: 1,2,3-butanotriol; pico 2: eritritol e pico 3: treitol. Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 50°C por 5 minutos, e aumento até 130°C, 6°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30 mL/minuto.....	63

Figura 20- Cromatograma obtido por CGL do padrão eritritol silanizado (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 50°C por 5 minutos, e aumento até 130°C, 6°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30mL/minuto.....	64
Figura 21- Cromatograma obtido por CGL do padrão treitol silanizado (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 50°C por 5 minutos, e aumento até 130°C, 6°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30 mL/minuto.....	65
Figura 22- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do eritritol obtido após oxidação, redução, hidrólise e silanização do polissacarídeo PS-32.....	66
Figura 23- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do treitol obtido após oxidação, redução, hidrólise e silanização do polissacarídeo PS-32.....	67
Figura 24- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,2,3-butanotriol obtido após oxidação, redução, hidrólise e silanização do polissacarídeo PS-32.	68
Figura 25- Cromatograma obtido por CGL dos alditóis acetilados parcialmente metilados obtidos a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação. Pico 1: 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metilfucitol; Pico 2: 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol; Pico 3: 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol; Pico 4: 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metilgalactitol. Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30mL/minuto.....	69

Figura 26- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 2,3,4-tri-O-metilfucose (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio fluxo total 30mL/minuto.....70

Figura 27- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 2,3,4,6-tetra-O-metilglucose (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio fluxo total 30mL/minuto.....71

Figura 28- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactose (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio fluxo total 30mL/minuto.....72

Figura 29- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 1,5-di-O-acetil-2,3,4,-tri-O-metilfucitol (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio fluxo total 30 mL/minuto.....73

Figura 30- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio fluxo total 30 mL/minuto.....74

Figura 31- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio fluxo total 30 mL/minuto.....75

Figura 32- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metilfucitol obtido a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação.....	76
Figura 33- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol obtido a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação.....	77
Figura 34- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol obtido a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação.....	78
Figura 35- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metilgalactitol obtido a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação.....	79
Figura 36- Espectro na região do IV do polissacarídeo PS-32.....	80
Figura 37- Espectro de RMN de ^1H do polissacarídeo PS-32.....	81
Figura 38- Espectro de RMN de ^{13}C do polissacarídeo PS-32.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Fatores de Retenção dos Alditóis Acetilados.....	35
Tabela II - Fragmentos de massas característicos dos alditóis acetilados dos resíduos de açúcares do polissacarídeo PS-32.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

a_r - abundância relativa

CG - cromatografia gasosa

CGL-EM - cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CP - cromatografia em papel

dimsil Na - íon metilsulfinil de sódio

DMSO - dimetil sulfóxido

int. - intensidade

IV - infravermelho

m/z - massa atômica/carga elétrica

RMN ^{13}C - ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ^1H - ressonância magnética nuclear de prótons

TFA - ácido trifluoroacético

TMS - trimetilsilanização

u.m. - unidade de massa atômica

RESUMO

A determinação da estrutura química de polissacarídeos tem sido objeto constante de estudo em todo o mundo. Através da determinação das características estruturais de um polissacarídeo é possível definir qual é o seu campo de aplicação, quais as suas possíveis funções em determinados produtos, e qual a sua atuação no comportamento reológico de uma substância.

Neste trabalho foram determinadas as características estruturais do polissacarídeo PS-32, obtido da fermentação aeróbica da bactéria *Beijerinckia* sp (cepa 32) isolada do solo cultivado com cana de açúcar em Ribeirão Preto, S.P., por VENDRUSCOLO, 1995.

As bactérias do gênero *Beijerinckia* sp são encontradas frequentemente em solos de clima tropical e se apresentam na forma de bastonetes Gram-negativos, sendo aeróbicas, catalase-positivas e fixadoras de nitrogênio molecular.

Para a produção do biopolímero PS-32 foi utilizado um meio de fermentação contendo 5% de sacarose como fonte de carbono, 0,05% de $MgSO_4$, 0,01% de K_2HPO_4 , 0,05% de KH_2PO_4 e 0,5% de triptose que foi inoculado com 5% de meio YM contendo a bactéria *Beijerinckia* sp. O caldo de fermentação permaneceu por 72 horas sendo aerado com agitação de 200 rpm a 25°C. Após este período, o caldo de fermentação foi centrifugado para retirada das células e o polissacarídeo foi recuperado por precipitação com etanol, seco em estufa a vácuo e triturado em moinho de bolas, rendendo de 7 a 9 g de polissacarídeo/L de caldo. Após este estágio, a proteína presente nas soluções do polissacarídeo foi retirada por hidrólise com papaína e as soluções sofreram sucessivas diálises contra água destilada, até purificação total.

As características da estrutura do polissacarídeo PS-32 foram estudadas utilizando técnicas cromatográficas acopladas ao espectrômetro de massa e ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C .

A CLAE foi utilizada para determinação e quantificação dos monossacarídeos presentes no polissacarídeo. Para tanto foram testadas duas formas de hidrólise: (i) HCl 1M, 70°C por 16 horas e (ii) TFA 2N, 100°C por 16 horas. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, Co. e os hidrolisados foram analisados em coluna (SCR-101-P,

Shimadzu, Co.) com as dimensões de 7,9 mm de diâmetro interno x 30 cm de comprimento, recheada com poliestireno sulfonado ligado com cátions de Pb^{+2} , com modo de separação por filtração em gel e pela estabilidade dos complexos formados entre os grupos hidroxílicos dos açúcares e o Pb^{+2} . A coluna foi mantida a 80°C, sendo usada água ultra pura como fase móvel com um fluxo de 0,6 mL/minuto. As amostras e padrões foram injetados através de injetor automático. Para detecção dos açúcares foi utilizado o detector de índice de refração, da marca Shimadzu, Co.. Os açúcares foram identificados pelos tempos de retenção dos padrões correspondentes e foram posteriormente confirmados por espectrometria de massa. Através das curvas de calibração com padrões externos, foram quantificados os açúcares glucose, galactose e fucose nas proporções de 3:1:3, respectivamente. Os produtos de hidrólise do polissacarídeo PS-32 hidrolisado com TFA apresentaram os melhores resultados.

Com o objetivo de confirmar os açúcares presentes no polissacarídeo e determinar as posições das ligações glicosídicas entre estes açúcares, o polissacarídeo foi metilado, segundo HAKOMORI, 1964, e em seguida hidrolisado, reduzido e acetilado, visando a obtenção dos alditóis acetilados parcialmente metilados. Tais alditóis foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa, ambos da marca Shimadzu, Co.. A coluna usada foi a coluna capilar DB-5 de sílica fundida, tipo fase ligada, 50 m x 0,22 mm, a razão de “split” de 1/100, com a seguinte programação de temperatura: 130°C nos 5 minutos iniciais e aumento de 7°C/minuto até 300°C, e como gás de arraste, hélio com um fluxo de 30 mL/minuto. O injetor e a interface foram ajustados para as temperaturas de 250 e 280°C, respectivamente. As amostras foram injetadas automaticamente. As análises no espectrômetro de massa foram feitas no intervalo de 40 a 600 u.m.a., com “scans” de 0,5 s, através de impacto eletrônico. Através dos tempos de retenção de compostos padrões e da interpretação dos espectros de massa foi possível a identificação dos seguintes alditóis acetilados parcialmente metilados: 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metilfucitol, 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol, 1,5- di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol e 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metilgalactitol.

Aliados aos dados obtidos acima, os dados da oxidação que indicaram a presença de glicaldeído, glicerol, treitol, eritritol e 1,2,3-butanotriol, levaram a concluir que os resíduos de glucose aparecem com

ligação em C1 (resíduo terminal) e também com ligações em C1 e C4; que os resíduos de galactose aparecem com ligações em C1, C4 e C6 e que os resíduos de fucose apresentam ligações em C1 e C4. Também através da oxidação foi possível observar a formação de um mol de ácido fórmico por unidade básica do polissacarídeo PS-32.

Os dados obtidos pela RMN de ^1H e ^{13}C forneceram informações sobre a configuração anomérica dos resíduos dos açúcares (glucose e galactose β e fucose α) e tamanho do anel, o qual foi comprovado também pelo espectro na região do infravermelho.

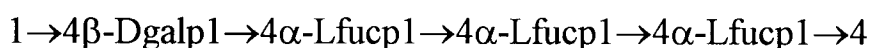
Uma possível estrutura para o polissacarídeo foi estabelecida, a qual é mostrada abaixo:



1

↓

6



SUMMARY

The determination of polysaccharides chemical structure has been studied all over the world. Through this determination it is possible to define where the polysaccharide could be employed, which are its possible functions in different products and how it will affect the rheological behaviour of a substance.

In this work the structural characteristics of PS-32 polysaccharide obtained from aerobic fermentation of *Beijerinckia* sp (strain 32) bacterium, isolated from soil cultivated with sugar cane in Ribeirão Preto, S.P. by VENDRUSCOLO, 1995 were studied. *Beijerinckia* sp bacteria are often found in tropical climate and show the following characteristics: gram-negative rods, aerobic, catalase-positive and chemoorganotrophic.

For PS-32 polysaccharide production it was used a medium containing sucrose 5%, MgSO₄, 0.05%, K₂HPO₄, 0.01%, KH₂PO₄ 0.05% and tryptose 0.5%. This media was inoculated with 5% of YM broth containing *Beijerinckia* sp. The fermentation broth was kept during 72 hours at 200 rpm and 25°C. After this period, the broth was centrifugated in order to separate the cells. The polysaccharide was recovered by ethanol precipitation, dried under vacuum and powdered. This procedure yielded 7-9 grams of polysaccharide/litre of broth.

After this step, the protein present in polysaccharide solution was eliminated by papain hydrolysis. The polysaccharide solution was dialysed against distilled water, until totally purified.

PS-32 polysaccharide structure features were studied by high performance liquid chromatography, gas-liquid chromatography-mass spectrometry, nuclear magnetic resonance of ¹H and ¹³C and IR.

HPLC was used in order to determine and quantify monosaccharides present in PS-32 polysaccharide. Therefore, were tested two kinds of hydrolysis: (i) 1M HCl, 70°C, 16 h and (ii) 2N TFA, 100°C, 16 h. It was used a Shimadzu Co. HPLC and hydrolysates were analysed in a 7,9 mm x 30 cm column (SCR-101-P, Shimadzu Co.), with sulfonated polystyrene bonded to Pb⁺² cation (ligand exchange) and gel filtration separation. The

separation was based in the stability of complex between hidroxy groups and Pb^{+2} cation, too. The column temperature was 80°C. It was used ultrapure water as mobile phase, with flow of 0,6 mL/minute. An automatic injector of samples was used. The refractive index detector was used to detect sugars. Sugars were identified by the retention time of corresponded standards and confirmed by mass spectrometry. Using calibration curves with external standards it was quantified glucose:galactose:fucoze at the proportion of 3:1:3, respectively. TFA hydrolysate showed best results.

In order to confirm the sugars composition in PS-32 polysaccharide and determinate glycosidic linkages positions between these sugar residues, PS-32 polysaccharide was methylated according to HAKOMORI, 1964, hydrolysed, reduced and acetylated. It was obtained acetalic alditols parcialy methylated. This alditols were analysed in a Shimadzu Co. GC-MS. It was used a fused-silic bonded capillary column DB-5, 22 mm X 50 m, split of 1/100 and a temperature program: 130°C during the 5 initial minutes, arising to 300°C, 7°C/minute. It was used helium as carrier flow at 30 mL/minute. Injector and interface temperatures were 250 and 280°C respectively. It was used an automatic injector of samples. MS analysis were made in a range of 40 to 600 a.m.u., with scans of 0,5 s, using electronic impact. Through the retention time of standard alditols and mass spectrometry, it was possible to identify: 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylfucitol, 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol, 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol and 1,4,5,6-tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methylgalactitol.

Together with above data, oxidation data that indicated the presence of glycoaldehyde, glycerol, threitol, erythritol and 1,2,3-butanetriol, lead to conclude that glucose residues showed C1 linkages (terminal residue), and C1 and C4 linkages; that galactose residues showed C1, C4 and C6 linkages and fucoze residues showed C1 and C4 linkages. Through oxidation it was possible to note the formation of one mol of formic acid by polysaccharide basic units.

The NMR of 1H and ^{13}C data gave information about anomeric configuration of sugar residues (glucose and galactose β and fucoze α) and ring size, which was confirmed by infra-red spectroscopy.

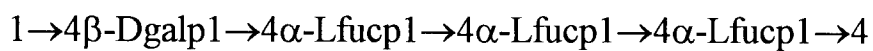
It was established a possible structure to PS-32 polysaccharide, which is showed below:



1

↓

6



1. INTRODUÇÃO

Polissacarídeos microbianos, também conhecidos como biopolímeros, são produzidos por quase todos os microrganismos vivos, no entanto, os mais facilmente adaptáveis para produção comercial são os fungos e as bactérias, pois possuem capacidade de crescer como cultura pura, em fermentações de larga escala e de produzir biopolímeros com alto potencial de aplicação em vários segmentos industriais.

Quando se pensa em indústria de alimentos, pode-se citar um vasto campo de aplicações para os biopolímeros, como por exemplo, agentes estabilizantes, espessantes, gelificantes e emulsificantes. Com uma ampla gama de usos e aplicações, os biopolímeros vêm substituindo gradativamente os polissacarídeos obtidos de fontes tradicionais, como plantas e animais.

Selecionar variedades de microrganismos que produzam polissacarídeos em grande quantidade e conseqüentemente economicamente interessantes, é um desafio que vem sendo enfrentado por vários grupos de pesquisa em indústrias, principalmente nos países desenvolvidos como Japão, EUA, Canadá e França.

Com os esforços de muitos anos, foi possível a obtenção de três principais biopolímeros que possuem hoje, permissão para serem adicionados a alimentos em todo o mundo. São eles a goma dextrana, composta de unidades de glucose e produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, a goma xantana, polissacarídeo de alto peso molecular, excretada pela bactéria *Xanthomonas campestris* e por fim, a mais recente descoberta, denominada goma gelana, o único biopolímero com características gelificantes conhecido até o momento, sendo produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea*.

O interesse industrial está concentrado nos polissacarídeos extracelulares, pois estes são de fácil extração e purificação, e apresentam um alto rendimento. Os mais importantes usos para estes polissacarídeos são como agentes espessantes e de suspensão ou como agentes gelificantes. Para satisfazer tais propriedades, o polissacarídeo deve possuir características reológicas tais que a viscosidade decresça marcadamente quando houver uma tensão de cisalhamento, e se recupere completamente na ausência da mesma. Em adição, estas propriedades devem ser retidas sob extremos de temperatura, variações de pH e de força iônica e na presença dos outros componentes do produto onde o polissacarídeo será aplicado.

Para que seja possível o conhecimento de tais propriedades dos polissacarídeos, para futuras aplicações industriais, se faz necessário o estudo da estrutura primária dos mesmos, ou seja, qual o tipo e número de sacarídeos

componentes, como estes se encontram ligados entre si, tamanho e formato dos anéis glicosídicos e se existem ramificações ou não.

Quanto à determinação da estrutura química de um polissacarídeo, esta é uma etapa muito trabalhosa e que demanda muito tempo, para a qual muitos métodos têm sido propostos. A cromatografia líquida de alta eficiência das amostras hidrolisadas com ácido pode ser usada para determinar as unidades monoméricas. A metilação total seguida de hidrólise, redução e acetilação e análise dos derivados de açúcares mono, di, tri ou tetrametilados por cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência, permite a determinação da posição glicosídica, da cadeia principal, ramificações de cadeias laterais e do tamanho do anel. Os espectros de ressonância magnética nuclear de alta resolução de prótons e carbono 13, também fornecem informações sobre a estrutura, especialmente se a RMN é usada para a determinação de porções não glicosídicas, como piruvato, acetato ou outros substituintes em polissacarídeos bacterianos, assim como o tipo de ligação glicosídica.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar as características da estrutura química do polissacarídeo extracelular obtido a partir da fermentação aeróbica da bactéria *Beijerinckia* sp. isolada em nosso laboratório.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Análise de Carboidratos por Cromatografia Gás-Líquida e Espectrometria de Massa

2.1.1. Derivação de Polissacarídeos para Análise em CGL

A etapa fundamental no entendimento da estrutura química de um polissacarídeo é determinar as posições de ligações dos açúcares componentes deste polissacarídeo. O método mais frequentemente usado para isso é a análise por CGL dos derivados metilados e acetilados dos resíduos de açúcares envolvidos nas ligações glicosídicas.

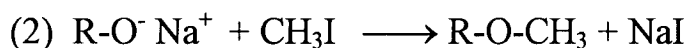
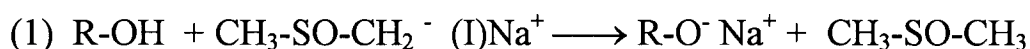
A primeira aplicação da CGL em carboidratos foi reportada por MCINNES (1958) e descrevia a metodologia para separar metilglicosídeos de monossacarídeos completamente metilados.

Os derivados permetilados dos metilglicosídeos de monossacarídeos inicialmente usados, apresentavam tempos de retenção relativamente altos e foram feitas então, tentativas para se encontrar derivados mais voláteis. Para isso, os monossacarídeos permetilados foram reduzidos com hidreto de boro e sódio e acetilados, fornecendo os derivados conhecidos como alditóis acetilados parcialmente metilados (BISHOP & COOPER, 1960).

Apesar dos consideráveis avanços nas tecnologias que permitem a derivação e a detecção de materiais em apenas alguns minutos, a estratégia básica para tais determinações tem permanecido a mesma. Os grupos hidroxílicos livres dos açúcares polimerizados são completamente metilados e após subsequentes hidrólises do polímero metilado, os grupos hidroxílicos que participavam das ligações glicosídicas são mostrados, revelando as posições das ligações. Em seguida, a redução química dos carbonos anoméricos aos seus respectivos álcoois, permite a acetilação de todas as posições remanescentes, estabelecendo assim, quais carbonos do anel do açúcar participavam das ligações glicosídicas (LINDBERG & LÖNNGREN, 1978 e CARPITA & SHEA, 1988).

Uma das pesquisas que marcou notadamente o estudo da derivação dos carboidratos, tornando-os assim compostos mais acessíveis e estáveis às análises, foi a metodologia desenvolvida por HAKOMORI (1964). Utilizando os íons sódio e carbônio, HAKOMORI (1964) conseguiu realizar a metilação de carboidratos à temperatura ambiente, em um processo contínuo e mais rápido que os outros anteriormente propostos. Os dois passos da reação

(formação do alcoóxido e metilação), mostrada abaixo, foram realizados em somente uma etapa:



onde R-OH representa o carboidrato, CH₃-SO-CH₃ o solvente sulfóxido de dimetila, (I)Na⁺ o íon sódio, CH₃-SO-CH₂⁻ o carbânion e CH₃I o agente metilante.

HAKOMORI (1964) realizou seus estudos na análise de estruturas de cerebrosídeos, glicogênio e ovomucóides, comprovando a eficácia de seu método e desde então, muitos trabalhos têm sido propostos e publicados baseados em suas técnicas.

Os polissacarídeos extracelulares obtidos a partir das bactérias *Pseudomonas elodea*, *Ps. putida* e *Ps. fluorescens*, tiveram suas estruturas elucidadas através das reações de metilação de HAKOMORI (1964), (JANSSON *et al.*, 1983; O'NEIL *et al.*, 1983 e READ & CONSTERTON, 1987). Após a metilação, estes polissacarídeos foram hidrolisados, visando a obtenção dos resíduos monossacarídicos parcialmente metilados, reduzidos, para a obtenção dos alditóis correspondentes a cada açúcar e então, acetilados. Os alditóis acetilados parcialmente metilados foram analisados através de CGL e CGL-EM.

No caso do polissacarídeo de *Pseudomonas elodea*, foram usadas colunas de vidro contendo 3% de OV-225 em GasChrom Q a 190°C (JANSON *et al.*, 1983) ou em coluna contendo 3% de SP2330 a 210°C (O'NEIL *et al.*, 1983). As análises de metilação do polissacarídeo obtido de *Pseudomonas elodea* forneceram 28% de 2,3-Me₂-ramnose, 21% de 2,4,6-Me₃-glucose, 24% de 2,3,6-Me₃-glucose e 26% de 2,3-Me₂-glucose. A 2,3 Me₂-D-glucose foi formada a partir do resíduo de ácido β-D-glucurônico que deveria estar ligado em O-4. Este resultado confirmou que o polissacarídeo era composto de unidades tetrassacarídicas repetidas. Os outros três resíduos nesta unidade eram dois β-D-glucopiranosil (ligados através de O-3 e O-4) e um resíduo α-L-ramnopiranosil (ligado através de O-4). A seqüência final das unidades

sacarídicas no polissacarídeo foi determinada como β -D-glucose, ácido β -D-glucurônico, β -D-glucose e α -L-ramnose (JANSSON *et al.*, 1983). Já O'NEIL *et al.* (1983), demonstraram a presença de ramnose, glucose e ácido urônico na relação molar de 1:1,5:1.

Para a determinação dos alditóis acetilados parcialmente metilados obtidos a partir dos polissacarídeos de *Ps. putida* e *Ps. fluorescens*, também foi utilizada coluna de vidro contendo 3% de OV-225 em GasChrom Q a 210°C. Para os polissacarídeos obtidos de *Ps. putida* e *Ps. fluorescens*, respectivamente, foram encontradas as seguintes proporções molares entre glucose e galactose: 1:0,88 e 1:0,87, sendo que os estudos de metilação não forneceram dados satisfatórios quanto às posições das ligações glicosídicas (READ & CONSTERTON, 1987).

Polissacarídeos como o S-130 produzido por *Alcaligenes* ATCC 31555 (JANSSON *et al.*, 1985), a glucana isolada da alga *Spirulina plateusis* (SEKHARAM *et al.*, 1989) e a dextrana sintetizada a partir de maltotriose, pela bactéria *Acetobacter capsulata* ATCC 11894 (YAMAMOTO *et al.*, 1993), também tiveram suas estruturas químicas determinadas a partir das análises de metilação estabelecidas por HAKOMORI (1964).

O polissacarídeo S-130 teve os seus alditóis acetilados parcialmente metilados separados por CGL em coluna capilar de sílica fundida SP-1000 a 200°C, sendo que por hidrólise do polissacarídeo metilado, com e sem redução prévia dos grupos carboxílicos, foram obtidos os seguintes produtos: 2,3,4-Me₃-ramnose, 2,3-Me₂-ramnose, 2,3,4,6-Me₄-manose, 2,4,6-Me₃-glucose, 2,3,4,6-Me₃-manose, 2,3-Me₂-ramnose e 2,3,4-Me₃-ramnose. Foi proposto então pelos autores, que o polissacarídeo era composto por unidades pentassacarídicas de β -D-glucose, ácido β -D-glucurônico, β -D-glucose (com ramificação de α -L-ramnose ou α -L-manose) e α -L-ramnose (JANSSON *et al.*, 1985).

Já a glucana obtida da alga *Spirulina plateusis*, após a completa metilação, foi hidrolisada, reduzida e acetilada para análises em CGL e CGL-EM. Foram usadas as colunas empacotadas com OV-225 ou ECNSS-M para a CGL e a coluna CP-Sil 5 com programação de temperatura de 70 a 220°C (2°C/min) para a CGL-EM. As análises dos resultados obtidos pela CGL e

CGL-EM, mostraram que três picos foram identificados como 2,3,4,6-Me₄-D-Glucose (16,4%), 2,3,6-Me₃-D-glucose (69,3%), e 2,3-Me₂-D-glucose (13,8%). Isto sugeriu que a glucana era ramificada, sendo a cadeia principal formada por ligações 1→4 com ramificações através de ligações 1→6 (SEKHARAM *et al.*, 1989).

A mistura dos alditóis acetilados parcialmente metilados provenientes da dextrana sintetizada por *Acetobacter capsulata* ATCC 11894, foi analisada por CGL em coluna TC-FFAP a 200°C ou em coluna ECNSS-M GasChrom Q 100/120 a 180°C. As análises cromatográficas mostraram a presença de 2,3,4,6-Me₄ : 2,3,4-Me₃ : 2,3,6-Me₃ : 2,3-Me₂-alditóis acetilados na proporção de 22,9:46,8:15,5:14,8. Este resultado indicou a existência de ramificações α-1,4 em cadeias lineares de glucosídeos α-1,6. Foi observada a presença de 6,23 pontos de ramificação e 6,53 resíduos de glucose ligados em α-1,4, nesta dextrana, para 100 unidades glicosídicas.

O procedimento de metilação descrito por HAKOMORI (1964) sofreu modificações, visando sua adaptação para aplicações nos mais diferentes polissacarídeos em estudo.

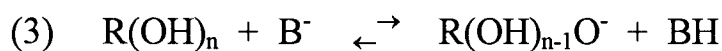
No caso do estudo da estrutura química dos polissacarídeos provenientes de grãos de café verdes os autores BRADBURY *et al.* (1990), utilizaram a modificação na metodologia de HAKOMORI (1964) que havia sido sugerida por PHILLIPS & FRASER (1981) e que consistia na mudança do íon dimetilsulfinil sódio pelo íon dimetilsulfinil potássio. Segundo PHILLIPS & FRASER (1981), esta mudança facilitaria o preparo dos reagentes e levaria a produtos metilados com maior grau de pureza. Para a metilação, sulfóxido de dimetila foi adicionado à amostra refrigerada, sendo o íon dimetilsulfinil potássio adicionado vagorosamente, tendo a mistura permanecido sob agitação durante toda a noite, quando então foi adicionado, o agente metilante iodeto de metila. Após completa metilação, os polissacarídeos foram submetidos à hidrólise até a obtenção dos monossacarídeos parcialmente metilados os quais foram convertidos em alditóis acetilados e analisados por CGL-EM. A identificação dos alditóis acetilados se deu por comparação com dados de CGL-EM publicados por BJÖRNDAL *et al.* (1967) e por comparação com padrões preparados por metilação e hidrólise de polissacarídeos de estrutura conhecida. Os autores encontraram que a fração de polissacarídeos em grãos de café robusta constituía 48% do peso seco e era composta de três polímeros: arabinogalactana, manana e celulose. A arabinogalactana possuía uma cadeia principal constituída de resíduos de galactose unidos em α-1,3 com resíduos

frequentes de arabinose e galactose como cadeias laterais, enquanto que a manana tinha uma estrutura linear de resíduos de manose unidos por ligações α -1,4.

No estudo da estrutura química de carragenanas produzidas por algas vermelhas, (STORTZ & CERZO, 1993), as alterações da metodologia de HAKOMORI (1964), sugeridas por STEVENSON & FURNEAUX (1991), foram aplicadas. Neste caso, o íon dimetilsulfínio sódico continuou a ser utilizado, tendo sido alterada a forma em que se encontrava o polissacarídeo, ou seja, este foi transformado em seu sal de trimetilamônio. Após a metilação, o polissacarídeo foi hidrolisado com ácido fórmico 40%, por 16 horas a 100°C. Os monossacarídeos obtidos foram convertidos em aldonitrilas acetiladas e analisados por CGL em coluna de sílica fundida coberta com SP2330, a 210°C. A presença de 2,3 e 3-Me-galactose nas carragenanas permetiladas não correspondeu à quantidade esperada, devido ao fato das unidades ligadas 4,6-sulfatadas serem ciclizadas para unidades 3,6-anidras no meio alcalino da metilação. Esta reação ocorreu em torno de 75-85% para as amostras cristocárpicas e em torno de 50% para as frações tetraspóricas, mostrando que a reação de ciclização foi menor em κ -carragenanas. A correlação destes estudos com dados prévios permitiu aos autores, a investigação e elucidação da estrutura química destes polissacarídeos.

O processo de metilação de HAKOMORI (1964) foi a base para os estudos de metilação realizados por CIUCANU & KEREK (1984), que foram posteriormente utilizados na investigação das estruturas dos polissacarídeos extracelulares antigênicos de *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium digitatum* realizada por MISCHINIK *et al.* (1994).

CIUCANU & KEREK (1984) basearam-se na capacidade de certos compostos de se tornarem agentes básicos para favorecer a reação de metilação. No método de HAKOMORI (1964), o ânion $\text{CH}_3\text{SOCH}_2^-$ gerado a partir do sulfóxido de dimetila e do hidreto de sódio, seria considerado como o agente básico efetivo, mas CIUCANU & KEREK (1984) provaram que os íons OH^- e H^- seriam na realidade os agentes básicos efetivos nas reações de metilação e ainda, descreveram a reação de metilação dos carboidratos como sendo a ionização sucessiva dos grupos hidroxílicos $\text{R}(\text{OH})_n$, catalisada por uma base B^- , seguida da metilação com o agente metilante, iodeto de metila (MeI), como pode ser observado nas reações abaixo descritas:



Ainda foi observado, que os solventes dipolares apróticos usados na reação de metilação, como o sulfóxido de dimetila, solvatavam os cátions e não solvatavam pequenos ânions, mas sim ânions maiores e polarizados, como o I^- . Então, nas reações de 3 a 5, a ocorrência da solvatação foi: $\text{B}^- < \text{R(OH)}_{n-1}\text{O}^- < \text{I}^-$. Reações paralelas, como a reação 6, geraram na CGL, picos não provenientes de açúcares. A reatividade dos grupos hidroxílicos nos carboidratos seguiu a sequência: glicosídicos > primários > secundários, e a cada vez que um grupo metila era introduzido, este diminuía a reatividade dos grupos hidroxílicos vicinais. Este fato explicou a reatividade muito pequena nos estágios finais de metilação. Por fim, os autores concluíram que a combinação de iodeto de metila, com um hidróxido de metal alcalino sólido e com sulfóxido de dimetila era excelente para a metilação de carboidratos, sendo desnecessária a presença de íons metilsulfonil de sódio ou de potássio. E ainda, que o método descrito foi rápido (alguns minutos comparados a horas na metilação de HAKOMORI, (1964)) e apresentou um elevado rendimento de açúcares metilados.

2.1.2. Espectrometria de Massa de Compostos Derivados de Açúcares

Em 1967, outra grande contribuição foi feita aos estudos de química dos carboidratos, através de CGL-EM, por BJÖRNDAL *et al.* que determinaram os padrões de fragmentação dos derivados de açúcares, aldióis acetilados parcialmente metilados, que são compostos voláteis e estáveis às temperaturas da cromatografia gasosa.

Os alditóis acetilados parcialmente metilados foram obtidos de seus açúcares originais, após metilação pelo método de HAKOMORI (1964) seguido de redução com hidreto de boro e sódio e acetilação com anidrido acético-piridina. Os compostos foram dissolvidos em diclorometano e injetados em uma coluna ECNSS-M a 180°C. Os espectros de massa foram feitos a 250°C, com potencial de ionização de 70 eV. Com os resultados BJÖRNDAL

et al. (1967) estabeleceram os principais picos de fragmentação para cada composto.

Em 1970, dando continuidade às suas pesquisas, BJÖRNDAL *et al.* estabeleceram as seguintes características referentes à espectrometria de massa de alditóis acetilados parcialmente metilados:

I. Derivados com o mesmo padrão de substituição originavam espectros de massa muito similares, típicos daquele padrão de substituição. As pequenas diferenças que foram observadas nas intensidades relativas dos picos para os estereoisômeros foram insuficientes para identificações não ambíguas.

II. O pico base do espectro foi geralmente o m/z 43 u.m.. ($\text{CH}_3=\text{O}^+$).

III. Os fragmentos primários eram produzidos pela clivagem entre os átomos de carbono da cadeia. As clivagens entre um carbono metoxilado e um acetoxilado eram preferíveis às clivagens entre dois carbonos acetoxilados. O fragmento com o grupo metoxila sempre levava a carga positiva (radicalar catiônico).

IV. Quando a molécula continha dois carbonos metoxilados adjacentes, por exemplo, os alditóis acetilados derivados de 2,3,6-Me₃-D-glucose e 2,3,4-Me₃-L-fucose, a fissão entre eles era preferível à fissão entre um deles e um carbono acetoxilado vizinho. Ambos os fragmentos desta clivagem foram encontrados como íons positivos.

V. Os fragmentos secundários foram formados a partir dos fragmentos primários por uma única e consecutiva perda de ácido acético (m/z 60), ceteno (m/z 42), metanol (m/z 32) ou formaldeído (m/z 30).

Os autores concluíram, então, que os métodos baseados em CGL-EM, visando a determinação de estruturas químicas, iriam provavelmente tomar o lugar de métodos clássicos utilizados para análises de polissacarídeos e de outros carboidratos.

2.1.2.1. Características dos Espectros de Massa dos Derivados de Hexopiranoses Unidas por Ligações Glicosídicas

A fragmentação de muitos dos derivados das unidades de hexoses é frequentemente caracterizada baseando-se na abundância dos fragmentos primários dos carbonos-4 e algumas vezes dos carbonos-5 e dos seus respectivos fragmentos secundários. Por exemplo, na fragmentação de derivados de hexoses ligadas pelo C-2, tem-se os principais fragmentos m/z 190 e 161 u.m., provenientes da clivagem entre dois carbonos metoxilados adjacentes (Figura 1). Os carbonos metoxilados adicionais que se encontram dentro da cadeia do derivado hexitol, no entanto, formarão os fragmentos m/z 205 e 234 u.m. provenientes das clivagens entre os C-2 e C-3 e C-4 e C-5, e seus fragmentos secundários, m/z 145 e 174 u.m., cada um resultante da perda de ácido acético por β -eliminação (Figura 1).

A substituição acetílica no O-3, resulta no único fragmento m/z 234 u.m., em adição aos m/z 118 e 161 u.m., que indicam que as posições C-2 e C-4 devem estar metoxiladas. A abundância do m/z 234 u.m. relativamente alta, resulta parcialmente do fato de que existem carbonos metoxilados não adjacentes neste derivado (Figura 2). A clivagem de carbonos metoxilados adjacentes dos derivados de hexopiranoses ligadas em 4, resulta m/z 118 e 233 u.m. como fragmentos primários, e o m/z 162 u.m. também é diagnosticado, indicando que ambos, C-2 e C-3 devem estar metoxilados (Figura 3). A fragmentação de derivados de unidades de hexopiranoses ligadas em 6 é muito similar àquela dos derivados ligados em 4, com uma diferença significativa. O fragmento m/z 189 u.m. indica que o O-6 deve possuir uma substituição acetílica, já a substituição no O-4, e a subsequente clivagem entre o C-3 e C-4, não pode resultar na formação do carbocátion (Figuras 3 e 4).

A identificação de unidades hexopiranosídicas ramificadas requer a detecção de massas elevadas, devido à presença de carbonos acetoxilados adjacentes. Um fragmento do C-4 sustentando três carbonos acetoxilados e um metoxilado, é o fragmento m/z 261 u.m.. A presença do m/z 262 u.m. indica que o fragmento que possui o deutério deve ter um único grupo metílico na posição do carbono 4 (Figura 5). Além do mais, a detecção do m/z 161 u.m. é a informação restante, necessária para completar a análise de um derivado de uma unidade de hexopiranosídeo ligado por 2,3. Da fragmentação das unidades de hexopiranosídeos ligados por 2,4 e 2,6, com um acetila no O-2 e um metila no O-3, resulta o m/z 190 u.m., sendo que dos carbonos acetoxilados adjacentes dos derivados de 2,4-hexoses, resulta o m/z 233 u.m. como segundo fragmento primário (Figura 6). Os derivados de 2,6-hexoses são simétricos,

produzindo dupletes em m/z 189 e 190 u.m., através da perda de ácido acético por β -eliminação (Figura 7).

Outros derivados com ligações envolvendo o C-3 são unidades de 3,4- e 3,6-hexopiranosídeos e que são comuns em muitos polissacarídeos e glicoproteínas. Os três carbonos acetoxilados adjacentes dos derivados de unidades ligadas por 3,4 resultam na detecção do fragmento primário do C-5, m/z 305 u.m., muito raro. Já a metilação do O-4 dos derivados de unidades de 3,6-hexosilas torna possível os fragmentos primários m/z 189 e 234 u.m., que comprovam a ligação pelo C-3 (Figuras 8 e 9). As ligações entre 4,6-hexopiranoses, formam carbonos metoxilados adjacentes (C-2 e C-3), e fornecem o par m/z 118 e 261 u.m. na fragmentação primária (Figura 10), (CARPITA & SHEA, 1988).

2.1.2.2. Características dos Espectros de Massa dos Derivados de Desoxi-hexoses Unidas por Ligações Glicosídicas

A fragmentação dos derivados de desoxi-hexoses é simples e direta, devido à presença do grupo metila. Os derivados de unidades de 2,6-desoxi-hexoses contém carbonos metoxilados adjacentes que fornecem m/z 131 u.m., que é diagnóstico do grupo metílico terminal e de metilação no O-4, e também m/z 190 u.m. que indica a acetilação na posição O-2 (Figura 11). A fragmentação primária entre C-2 e C-3, menos frequente, rende quantidades significativas do m/z 175 u.m. e m/z 115 u.m., devido à perda do ácido acético por β -eliminação; estes fragmentos confirmam a ligação no O-2. A acetilação no O-3 resulta o m/z 131 u.m., mas o m/z 118 u.m. é o maior fragmento primário (Figura 12). Um fragmento primário possível de ser identificado é o m/z 247 u.m., que pode ou não ser detectado, o qual perde metanol por β -eliminação (m/z 215 u.m.) ou ácido acético por γ -eliminação (m/z 187 u.m.), fragmentos estes que devem ser detectados (Figura 12). Ligações na posição O-4 eliminam o m/z 131 u.m., que serve como diagnóstico, mas a clivagem de carbonos metoxilados adjacentes forma o m/z 203 u.m., o qual por perda de ácido acético produz o m/z 143 u.m. (Figura 13), e o m/z 118 u.m. confirmando que o O-2 estava metilado.

Uma unidade de desoxi-açúcar ramificado comum em pectinas de plantas é a ramnose ligada em 2,4 e a sua fragmentação é facilmente analisada. A fragmentação primária se dá em cada lado de um único carbono metoxilado, produzindo quantidades aproximadamente iguais do m/z 203 u.m., indicando a acetilação no O-4, e do m/z 190 u.m., indicando acetilação no O-2. Os

fragmentos secundários maiores, m/z 143 e 130 u.m. são provenientes da perda usual do ácido acético por β -eliminação (Figura 14). O m/z 101 u.m. detectado provém da perda de metanol do m/z 143 u.m. que é menos estável, e o m/z 88 u.m. é devido à perda de ceteno do m/z 130 u.m. (CARPITA & SHEA, 1988).

2.2. Análise da Estrutura Química de Polissacarídeos por Oxidação com Periodato

A oxidação com periodato e sua forma modificada conhecida como degradação de Smith, envolve a oxidação dos resíduos de açúcar do polissacarídeo com periodato, seguida de redução com boridreto e e hidrólise ácida do polissacarídeo. Um dado resíduo de açúcar, onde os grupos hidroxílicos vicinais se encontram livres, ou seja, não participam de ligações, está sujeito à oxidação na ligação carbono-carbono, fornecendo dialdeídos como produtos (estas reações se encontram ilustradas na Figura 15). Açúcares que contenham ligações em O-3 ou que sejam dissubstituídos em 2,4-O, não contém grupos hidroxílicos vicinais livres e não estarão sujeitos à oxidação com periodato. Com base na composição dos produtos da degradação das unidades de açúcares oxidadas e na quantidade de periodato consumido, é possível obter muitas informações à respeito de estruturas complexas dos polissacarídeos. Os produtos mais comumente encontrados após a oxidação com periodato dos carboidratos são gliceraldeído, glicolaldeído, glicerol, etileno glicol, eritritol e treitol (ENGLMAIER *et al.*, 1988). DUTTON *et al.* (1968), listaram os produtos de degradação esperados para arabinosilanas, glucomanas e galactoglucomanas analisando estes produtos na forma de seus derivados TMSilanisados. Já BAIRD *et al.* (1973), analisaram estes produtos na forma de aldonitrilas acetiladas ou alditóis.

Os estudos de oxidação dos carboidratos com periodato têm sido amplamente utilizados em conjunto com as técnicas de metilação e acetilação, visando obter informações mais detalhadas sobre as ligações entre as unidades monossacarídicas constituintes dos polissacarídeos (PAZUR, 1986).

Na caracterização da fucogalactana produzida por *Rhodotorula glutinis* K-24, FUKAGAWA *et al.* (1975), constataram os compostos 1,2-propanodiol e 1,2,3-butanotriol como provenientes dos resíduos de fucose, glicerol e treitol provenientes dos resíduos de galactose e glicolaldeído e gliceraldeído como provenientes dos resíduos de fucose e galactose;

observaram ainda a presença dos açúcares fucose e galactose intactos, significando que não haviam sofrido oxidação. As análises por cromatografia gás-líquido dos compostos hidroxílicos e oximas produzidos pela degradação de Smith mostraram que todos os resíduos de fucose estavam localizados nas cadeias laterais com alguns resíduos de galactose. Toda cadeia lateral mostrou ser composta de açúcares ligados em 1→2 e/ou 1→6 e terminando com um resíduo de fucose.

Nos estudos estruturais de uma heteroglucana, na sequência de análises envolvendo oxidação com periodato, redução com boroidreto, hidrólise ácida e cromatografia em papel foi possível observar que mais de 95% dos resíduos de galactose e menos de 5% dos resíduos de glucose foram oxidados pelo periodato. Foi possível constatar a presença dos produtos previstos pela degradação da galactose, treitol e glicerol (PAZUR *et al.*, 1977).

Já para a glucana estudada por SEKHARAM *et al.* (1989), foi estabelecida uma relação entre o consumo de periodato e a liberação de ácido fórmico por unidade de açúcar anidro, além de se identificar após a oxidação, redução e hidrólise do polissacarídeo os produtos glicerol e eritritol.

2.3. Análise de Carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O ramo da cromatografia que mais se desenvolveu nos últimos anos foi a CLAE. No início, a separação de mono- e oligossacarídeos baseava-se na troca iônica do complexo carboidrato-borato, que requeria no mínimo 20 dias para a separação de poucos carboidratos. Hoje em dia, a separação de monossacarídeos, é feita em apenas alguns minutos, com reduzidas quantidades de amostras. Como não poderia deixar de ser, a determinação de carboidratos também evoluiu com a CLAE, que é uma técnica que não exige derivação dos açúcares e tampouco estabilidade térmica, como a CGL (HONDA, 1984).

A CLAE tem simplificado a difícil tarefa de determinar açúcares monoméricos e oligoméricos, tendo sua capacidade sido aumentada pela introdução de colunas de resinas com íons fixados, o que levou ao desenvolvimento da cromatografia de partição iônica e também ao desenvolvimento de colunas específicas para análise de carboidratos. Tais resinas possuem uma matriz de poliestireno-divinil-benzeno com um grau de ligações cruzadas de 4-8% com grupos de ácido sulfônico contendo um íon

catiônico em particular. A resina é usada de modo que não haja troca iônica, sendo que os íons catiônicos permanecem na coluna, efetuando a separação desejada. A escolha dos cátions determina a seletividade e resolução da análise a ser efetuada. As resinas ligadas ao cálcio II têm encontrado uso geral na separação de mono e oligossacarídeos com um grau de polimerização (GP) de 4 e também álcoois de açúcares. Já resinas ligadas à prata I são mais seletivas para oligossacarídeos até GP 11, e as resinas ligadas ao chumbo II, são seletivas para uma variedade de açúcares monoméricos.

A CLAE apresenta vários campos de aplicação na análise de mono, oligo e polissacarídeos (HONDA, 1984). Um destes campos é o uso da CLAE visando a separação e detecção dos monossacarídeos e oligossacarídeos liberados durante a hidrólise enzimática de polissacarídeos. Através dos resultados obtidos é possível determinar a forma da atuação de uma enzima, sua especificidade e as condições ótimas de sua atividade. Estudos deste tipo foram realizados em amostras de celulose, arabinana, galactana e xilana, que após serem tratadas enzimaticamente, tiveram seus produtos de hidrólise, devidamente purificados, analisados por CLAE, utilizando para isso coluna de troca iônica ligada com chumbo II a 85°C e água ultrapura como fase móvel. Os monossacarídeos foram detectados por detector de índice de refração. Os resultados obtidos demonstraram que a coluna de resina ligada ao chumbo II (HPX-87P) permitiu uma estimativa rápida e sensível da composição dos polissacarídeos digeridos enzimaticamente. Oligômeros com GP 4 puderam ser separados, sendo que oligômeros maiores e resíduos do substrato passaram pela coluna, não sendo retidos. Esta metodologia permitiu uma análise sensível e rápida dos produtos de degradação dos vários polissacarídeos, no estudo da determinação da estrutura destes polissacarídeos (VORAGEN *et al.*, 1986).

Estudos envolvendo a atividade enzimática em fibras (polpa de beterraba, grão de trigo e casca de ervilha), seguida de metanólise, também foram monitorados pela CLAE. Foram usadas enzimas pectinolíticas visando uma pré-hidrólise e completa liberação dos ácidos urônicos constituintes das fibras, após o que, foi aplicada a metanólise. A CLAE dos produtos de hidrólise/metanólise foi realizada em cartucho SuperSpher C₁₈, usando água ultrapura como eluente e monitoração do material eluído através de detector de índice de refração. O método proposto foi conveniente para a determinação da composição de monossacarídeos das fibras já citadas e ofereceu resultados melhores que aqueles obtidos por hidrólise com ácido sulfúrico (QUEMENER *et al.*, 1993).

A CLAE também vem sendo utilizada na identificação e quantificação de produtos da hidrólise ácida de polissacarídeos. A frutana obtida do trigo foi parcialmente hidrolisada com HCl e os produtos da hidrólise foram analisados através de duas colunas C₁₈ em série, com a finalidade de aumentar a resolução; sendo que água foi utilizada como fase móvel e os produtos foram detectados por índice de refração. Os resultados obtidos levaram a uma considerável separação de numerosos oligômeros da frutana. A separação de três frutanas com grau de polimerização conhecidos (GP3) se deu em 8 minutos e para as frutanas com GP4 se deu em torno de 15 minutos. O uso do índice de refração como detector, tornou possível a detecção de 0,1 microgramas de carboidrato na amostra injetada, sendo obtida uma resposta linear quando a amostra foi maior que 0,1 mg, tornando a identificação possível também para grandes quantidades. Com a resolução da CLAE foi possível detectar e quantificar pequenas quantidades de alguns compostos na presença de grandes quantidades de outros compostos (BANCAL & GAUDILLÈRE, 1989).

Comparações entre as hidrólises com ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético e metanólise/ácido trifluoroacético de polissacarídeos contendo ácido gulurônico foram possíveis devido ao emprego da CLAE (DE RUITER *et al.*, 1992). Em se tratando de polissacarídeos contendo os ácidos glucurônico e manurônico, KRULL & COTE (1992), realizaram a hidrólise ácida destes polissacarídeos com ácido trifluoroacético e se utilizaram da cromatografia iônica acoplada a um detector de pulso amperométrico. A separação dos açúcares foi considerada rápida, e completou-se em 15 minutos de corrida. As vantagens do uso da cromatografia iônica acoplada ao detector de pulsos amperométrico para a determinação da composição de polissacarídeos aumentou a sensibilidade da CLAE convencional, eliminando a necessidade de formar derivados alditólicos, e permitindo assim, maior facilidade no preparo das amostras.

A aplicação da CLAE na análise de carboidratos durante processos de fermentação possui muitas vantagens quando comparada aos métodos convencionais existentes (enzimáticos), e se tornou de grande aplicação neste campo (CHAPLIM & KENEDY, 1986). Visando estudar os produtos e componentes de um meio de fermentação, PLAGA *et al.* (1989),

utilizaram a CLAE, testando três tipos de colunas: coluna Nucleosil-NH₂ e coluna LiChrosorb-Diol, sendo o eluente acetonitrila:água (75:25), à temperatura ambiente e a coluna de troca catiônica Aminex HPX-87C, a 85°C, sendo água ultrapura o eluente. Para os três tipos de colunas foi usado o detector de índice de refração. Os autores concluíram que apesar da técnica de CLAE para a quantificação de carboidratos em meios de fermentação complexos ter se mostrado universal, rápida, acurada e seletiva, requerendo o mínimo tratamento das amostras, existiram alguns problemas relacionados à ela. A desvantagem das colunas com fases amino e diol foi a pequena estabilidade destas colunas durante análises de rotina, sendo caracterizada por tempos de retenção menores e procedimentos complicados para a calibração. A reprodutibilidade e sensibilidade decresceram quando comparada com a CLAE em coluna de troca catiônica.

2.4. Análise de Carboidratos por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C

A espectroscopia de RMN de ¹³C e de ¹H representa o método geral mais efetivo na investigação da estrutura, dinâmica molecular e tipos de ligações dos polissacarídeos. Como uma ferramenta para determinar os produtos de hidrólise ácida das gomas locusta e guar, BOCIEK *et al.* (1981), utilizaram a RMN de ¹³C e obtiveram relações man/gal para a composição de cada goma. Estas relações foram as mesmas obtidas através de determinações dos alditóis acetilados em CGL das mesmas amostras parcialmente hidrolisadas de galactomananas. Foi observado que devido à grande viscosidade das soluções concentradas de galactomananas não hidrolisadas, foi muito difícil a obtenção de espectros de boa qualidade. No entanto, os espectros foram facilmente distinguíveis um do outro, e tiveram uma semelhança próxima aos espectros de gomas parcialmente hidrolisadas. Foi observado também, que os picos de galactose nos espectros de gomas hidrolisadas foram algumas vezes mais intensos que nos espectros de gomas não hidrolisadas, o que deve ter se dado devido à mudanças no tempo de distensão, já que as análises químicas mostraram que ocorreu uma pequena perda de galactose. Este método foi muito usado para análises de rotina das características estruturais de galactomananas em preparados alimentares e para identificação de galactomananas na presença de carragenanas.

Para a determinação da estrutura do polissacarídeo do caraguatá, SCAMPARINI (1980) utilizou as técnicas de RMN de ^{13}C e de ^1H , visando obter os ambientes em que se encontravam os grupos hidroxílicos dos açúcares constituintes do polissacarídeo e a configuração anomérica de tais açúcares. Utilizando-se também de CGL, SCAMPARINI (1980) determinou que a estrutura do polissacarídeo continha unidades de β -D-galactose, β -D-xilose e α -L-arabinose na proporção de 5:2:2. Também foi possível determinar que a cadeia principal do polissacarídeo era constituída por unidades de D-galactose e D-xilose com ligações glicosídicas 1 \rightarrow 4, e que suas cadeias laterais eram formadas por unidades de D-galactopiranosose, L-arabinopiranosose e L-arabinofuranose.

No estudo de substâncias pécticas, visando determinar o grau de esterificação da pectina, sua capacidade de gelificação e sua relação sinérgica com o alginato, GRASDALEN *et al.* (1988), demonstraram a capacidade da utilização da RMN de ^1H em alta frequência, para monitorar as sequências das unidades das pectinas analisadas. Ainda se tratando de pectinas, RYDEN *et al.* (1989), utilizaram análises de metilação e espectroscopia de RMN de ^{13}C para determinação da localização das unidades de galactose nas partes central e terminal da cadeia. Os resíduos de galactose ligados em 1 \rightarrow 3 encontrados por análises de metilação não foram detectados pela espectroscopia de RMN, ou porque a quantidade era muito pequena ou possivelmente devido à baixa mobilidade destes resíduos na região próxima à cadeia rígida. A proporção de resíduos de galactose terminal nas cadeias de galactanas ligadas por 1 \rightarrow 3 ou 1 \rightarrow 4 não puderam ser determinadas pelos resultados das análises de metilação, o que foi notado pela discrepância entre as análises de metilação e da espectroscopia de RMN ^{13}C .

Outra aplicação muito importante da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e de ^1H é na caracterização da conformação molecular de polissacarídeos. GIDLEY *et al.* (1991), compararam galactomananas e glucomananas em três estados: em pó, hidratadas e em forma de gel. A comparação dos modelos dos espectros de ^{13}C sugeriu que os hidratados, sóis e géis de galactomananas, continham moléculas de mananas com conformação similar àquela encontrada em moléculas de glucomananas em géis. Os espectros de pós secos de galactomananas mostraram bandas largas, provavelmente devido à presença de uma série de estados conformacionais. A comparação dos espectros de amostras em estado sólido e na forma gelificada, sugeriu que segmentos relativamente rígidos da cadeia eram ricos de resíduos

manosil para galactomanana de locusta e de resíduos glucosil para glucomananas de goma "konjac", respectivamente.

Este estudo forneceu evidências da utilidade de métodos de RMN para determinação da ordem molecular em sistemas de polissacarídeos. Esta abordagem é particularmente poderosa quando os espectros podem ser obtidos a partir de amostras que possuam caracterização prévia quanto aos seus modelos de difração. Espectros deste tipo devem ser considerados como fornecedores de "fingerprints" para as estruturas moleculares, formando a base de redes cristalinas observáveis por difração.

Uma grande quantidade de estudos envolvendo polissacarídeos muito complexos vem sendo feita, utilizando-se para isso as técnicas de CLAE, CGL-EM, FAB, RMN de ^{13}C e de ^1H em conjunto (ASPINALL *et al.*, 1993; GRUE *et al.*, 1993; WOOD *et al.*, 1991 e SHASHKOV *et al.*, 1993). Como exemplo, pode-se citar o estudo da estrutura do polissacarídeo produzido pela bactéria *Citrobacter* O16, feito por KOCHAROVA *et al.* (1994), onde as variadas análises dos produtos da hidrólise ácida do polissacarídeo revelaram que este possuía duas cadeias laterais, uma terminando com um resíduo de glucose e outra com um resíduo de galactose, um resíduo de 2,4,6-glucose trissubstituída, um resíduo de galactose 6-substituído, em um dos resíduos de GalNac 3-substituído. Os autores chegaram à conclusão que a estrutura do LPS de *Citrobacter* O16 era constituída de D-glucose, D-galactose, 2-acetamida-2-desoxi-D-galactose, glicerol e fosfato nas proporções de 2:2:2:1:1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material Permanente

Incubador/agitador com ambiente controlado, marca New Brunswick Scientific, modelo Psychroterm G-27;

Estufa bacteriológica, marca Fanem, modelo 002 CB;

Estufa de secagem e esterilização, marca Fanem, modelo 315 SE;

Autoclave vertical, marca Phoenix, modelo AV-75;

Câmara de fluxo laminar, marca Tecnal, modelo 115;

Liofilizador Labconco, LiphLock 18;

Centrífuga refrigerada, marca Sorvall, modelo RC5C;

Potenciômetro, marca Digimed, modelo DMPH-2;

Moinho de bolas microtritador, marca Tecnal, modelo TE - 350;

Balança semi-analítica Micronal, modelo B-600;

Balança analítica A & D, modelo FR-200;

Destilador de Água;

Purificador de Água, Barnstead;

Evaporador Rotatório, marca Buchler, Labconco, modelo 421 - 1755;

Polarímetro Fotoelétrico de precisão 0,005°, marca Karl Zeiss;

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu Co., modelo LC-10, equipado com forno, injetor automático de amostras, processador de dados, monitor e impressora;

Detectores: índice de refração, modelo RID 6A e ultravioleta, modelo SPD-10AV, ambos marca Shimadzu Co.;

Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massa Shimadzu Co., modelo QP 5000, equipado com processador de dados, monitor e impressora;

Espectrômetro de ressonância magnética nuclear, marca General Electric, com estação de tratamento de dados Macintosh II;

Espectrofotômetro de infravermelho, marca Perkin Elmer, FT-IR 16 C;

Espectrofotômetro UV-Visível, Beckman, modelo DU 70.

3.1.2. Material de Consumo

Os reagentes utilizados foram das marcas Merck, Ecibra, Vetec e Sigma, sendo que os reagentes para as análises cromatográficas foram de grau cromatográfico. Os padrões cromatográficos foram todos obtidos comercialmente, marca Sigma, com exceção dos compostos derivados da fucose, que foram metilados e acetilados no laboratório. Os meios de cultura utilizados na produção do polissacarídeo PS-32, foram da marca Difco.

3.2. Métodos

3.2.1. Produção do polissacarídeo PS-32

A produção do polissacarídeo extracelular originário de *Beijerinckia* sp se deu segundo as condições determinadas por VENDRUSCOLO (1995).

A cepa 32, produtora do biopolímero PS-32, se encontrava em conservação em glicerol a -20°C. Para a produção de amostras o seguinte procedimento foi seguido:

Retirada dos tubos contendo a cultura de bactéria do freezer para descongelamento.

Preparo de um pré-inóculo contendo meio YM (meio I) com 5% de sacarose.

Inoculação das células após 24 h de crescimento, em meio produtor de células (meio II) nas seguintes condições: 25°C, 100 rpm por 24 h.

Inoculação das células em meio para produção de biopolímeros (meio III) nas seguintes condições: 25°C, 200 rpm por 72 h.

Composição dos meios utilizados:

Meio I (g/l): extrato de malte, 3; extrato de levedura, 3; peptona 5; sacarose, 10 e ágar, 20.

Meio II (g/l): extrato de malte, 7; extrato de levedura, 7; peptona, 17; sacarose, 10.

Meio III (g/l): sacarose, 50; extrato de levedura, 0,2; triptose, 2,0; K₂HPO₄, 2,0; Mg₂SO₄.7H₂O, 2,7 e KH₂PO₄, 13,62, com ajuste de pH para 6,5.

Após o período de fermentação, o caldo foi centrifugado a 10.500 x g, a 4°C por 20 minutos por três vezes, e filtrado em membranas de celulose de 1,2 µm de poro, marca Millipore, para separação das células. O pH do caldo foi ajustado para 7,5 com adição de NaOH, e então foi adicionado álcool etílico 50% (v/v). Após a precipitação do polissacarídeo, este foi separado por filtração, redissolvido em uma mistura de etanol:água, 80% (v/v), seco em estufa a vácuo a 25°C até peso constante e triturado em moinho de bola.

3.2.2. Testes Preliminares

3.2.2.1. Teste de Biureto

Para verificar a presença de proteínas na solução de polissacarídeo PS-32, foi realizado o Teste de Biureto da seguinte forma: uma gota da solução 0,1% de polissacarídeo foi colocada em tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL da solução de NaOH 5 M e a mistura foi agitada até completa dissolução do polissacarídeo. Então, foi adicionado 1 mL do reagente de biureto, a mistura foi agitada e permaneceu em repouso por 10 minutos. Também foram feitos um tubo branco (sem amostra, coloração azul), e um tubo padrão contendo papaína (coloração rosada), para verificação da coloração.

3.2.2.2. Determinação da presença de açúcares redutores (Prova de Fehling)

Foi realizada a Prova de Fehling na amostra do polissacarídeo PS-32, segundo o procedimento de LITWACK (1960), e para tanto, 2 mL de solução a 0,1% do polissacarídeo foram pipetados em tubo de ensaio. Foram adicionados ao tubo de ensaio, 2 mL do reagente de Fehling. O tubo foi então aquecido em banho-maria por 5 minutos e foi observada a formação ou não do precipitado vermelho no fundo do tubo.

3.2.2.3. Purificação enzimática do polissacarídeo PS-32

Em um tubo de ensaio de 50 mL foram colocados 20 mL de solução 1% do polissacarídeo e foi adicionado 1 mL de solução de enzima papaína (1g/mL), sendo o pH da mistura ajustado para 6,5 com solução de NaOH 0,1 N. Os tubos foram incubados a 55°C por 3 h.

Após o período de proteólise, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e colocada em sacos de diálise para eliminação dos aminoácidos e peptídeos presentes. A diálise se deu por 3 dias contra água destilada a 4°C. Após a diálise, o polissacarídeo foi reprecipitado com etanol 95% e seco a 50°C. Finalmente, o Teste de Biureto foi refeito para verificação da ausência de proteínas.

3.2.2.4. Umidade

A umidade foi determinada segundo o método 925.45 (AOAC), descrito por CLARKE (1995).

3.2.2.5. Cinzas

A determinação de cinzas foi feita segundo o método 900.02 (AOAC), descrito por CLARKE (1995).

3.2.2.6. Determinação da presença de ácidos urônicos

Para verificação da presença de ácidos urônicos na amostra, foi realizado o teste de carbazol-ácido sulfúrico, de acordo com MCCOMB & MCCREADY (1952). Em um tubo de ensaio foram colocados 0,5 g de polissacarídeo, 0,5 mL de etanol e 0,5 mL de água destilada sendo esta solução aquecida a 90°C por 5 minutos, até a completa dissolução do polissacarídeo. Duas gotas desta solução foram retiradas e resfriadas em banho de gelo, e então foram adicionados 12 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo esta solução aquecida por 5 minutos em ebulição. Após este período, a solução foi resfriada a 20°C em banho de gelo e 1 mL de solução de carbazol 0,1% foi adicionada. A amostra foi agitada e deixada em repouso por 60 minutos a temperatura ambiente, para desenvolvimento da cor. Foram feitos o tubo branco (sem amostra, coloração branca), e também o tubo padrão contendo uma solução de ácido galacturônico 0,2% (coloração vermelho-azulada).

3.2.2.7. Determinação da presença de piruvato

Para tal determinação, foi utilizada a metodologia de PETERS *et al.* (1993), onde o conteúdo de piruvato foi determinado pela oxidação do NADH, e detectado fotometricamente em um comprimento de onda de 340 nm. Foi utilizado o kit de reação Sigma 726.

3.2.2.8. Determinação da presença de grupos acetila

Para tal determinação foi usada a metodologia de MCCOMB & MCCREADY (1957), onde 10 mg do polímero foram misturados com 25 mL de solução de hidroxilamina, sob agitação, e então foram adicionados lentamente 25 mL de solução de NaOH (9,4 g/100 mL de água). A agitação

continuou até completa dissolução do polímero. Foram então pipetados 2 mL desta solução em frasco volumétrico de 25 mL e foram adicionados 5 mL de água e 5 mL de metanol ácido (previamente preparado em balão volumétrico com 32,5 mL de ácido perclórico 70% e adição de metanol absoluto até completar o volume de 500 mL). O volume foi então elevado a 25 mL com uma solução de perclorato férrico, (previamente preparada pela dissolução de 1,93 g de cloreto férrico em 5 mL de HCl concentrado e 5 mL de ácido perclórico 70%), a qual foi adicionada em pequenas doses, sendo o frasco agitado após cada adição. Após 5 minutos, a coloração foi determinada no comprimento de onda 520 nm, seguindo curva padrão da glucose peracetilada.

3.3. Estudos relacionados à identificação e quantificação dos monossacarídeos componentes do polissacarídeo PS-32

3.3.1. Hidrólise total do polissacarídeo PS-32 em meio ácido

3.3.1.1. Hidrólise com ácido clorídrico

A uma amostra de 3 gramas do biopolímero PS-32 foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico 1N, e esta solução permaneceu por 16 h em banho aquecido a 70°C. O mesmo procedimento foi realizado para 12 e 14 h de hidrólise. Após a hidrólise a solução foi neutralizada com carbonato de sódio até pH neutro e então foi feita a deionização pela adição de uma mistura de quantidades iguais das resinas Amberlite IR 45 forma OH, 28-35 mesh e Amberlite IR 120 forma H, 28-35 mesh.

Após estes procedimentos as amostras foram filtradas em membrana de celulose, com 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro, branca, lisa, da marca Millipore. Para tal filtração foram utilizadas unidades de filtro descartáveis.

3.3.1.2. Hidrólise com ácido trifluoroacético

A uma amostra de 100 mg do biopolímero PS-32 foram adicionados 10 mL de ácido trifluoroacético 2N e esta solução permaneceu por 16 h em banho aquecido a 100°C. Após este período o ácido trifluoroacético foi evaporado sob nitrogênio a 50°C. Após este procedimento, as amostras foram dissolvidas em água ultra pura, e filtradas em membrana de celulose, com 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro, branca, lisa, da marca Millipore. Para tal filtração foram utilizadas unidades de filtro descartáveis.

3.3.2. Identificação dos produtos da hidrólise total do polissacarídeo PS-32

3.3.2.1. Identificação dos açúcares neutros por cromatografia descendente em papel

Os monossacarídeos obtidos na hidrólise total do polissacarídeo PS-32 foram primeiramente identificados por cromatografia descendente durante 24 horas, em papel Whatman nº1. As amostras foram aplicadas em papel com espaços de 2 cm entre cada aplicação e este foi colocado em cuba cromatográfica cilíndrica previamente saturada com o sistema de solventes, acetato de etila-piridina-água na proporção de 8:2:1 (v/v). O papel foi seco e revelado com solução de nitrato de prata em acetona, NaOH alcoólico e por fim, lavado com tiosulfato de sódio, segundo ASPINALL *et al.* (1974). Como padrões foram utilizadas soluções 5% de glucose, manose, galactose, frutose, fucose, arabinose, xilose e ramnose.

3.3.2.2. Identificação e quantificação dos açúcares neutros por cromatografia líquida de alta eficiência

Para identificação e quantificação dos açúcares neutros foi usado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu Co.. Como fase móvel foi utilizada água ultrapura, degaseificada através de degaseificador, com gás hélio. Como padrões foram utilizados soluções dos açúcares neutros glucose, galactose e fucose, marca Sigma, nas concentrações de 1.000, 3.000 e 5.000 ppm, cada uma. A coluna empregada foi a coluna Shim-Pack SCR-101 P (Shimadzu Co.), empacotada com resina de poliestireno sulfonado (diâmetro da partícula 10 μm), carregada com cátions Pb^{+2} , com modo de separação por filtração em gel e por estabilidade dos complexos formados, com as dimensões de 7,9 mm de diâmetro interno x 30 cm de comprimento. Para sua proteção foi empregada uma pré-coluna de 4,0 mm x 5,0 cm. A temperatura da coluna foi ajustada para 80°C, e o fluxo da fase móvel para 0,6 mL/minutos. O volume de injeção foi de 40 μL , tendo sido utilizado o injetor automático de amostras. Para detecção dos açúcares foi utilizado o detector de índice de refração, da marca Shimadzu Co..

3.4. Determinação das posições das ligações glicosídicas dos monossacarídeos constituintes do polissacarídeo PS-32

3.4.1. Oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio

De acordo com a metodologia empregada por FUKAGAWA (1975), uma amostra de 400 mg do polissacarídeo purificado, foi dissolvida em 100 mL de solução de periodato de sódio 0,1 M. O frasco de reação foi envolto em uma folha de alumínio e deixado a 5°C por 48 h. Após este período, o excesso de periodato foi destruído com a adição de 2,8 mL de etileno glicol. Em seguida a mistura foi tratada com 1,5 g de hidreto de boro e sódio a 5°C durante 12 h. Após este período, adicionou-se 2,6 mL de ácido acético até pH 5,0, para decomposição do excesso de hidreto de boro e sódio. Foi feita então uma diálise contra água destilada por 48 h a 4°C para remoção de substâncias de baixo peso molecular, após o que, o polissacarídeo foi liofilizado. O polissacarídeo oxidado e reduzido (200 mg) foi dissolvido em 40 mL de HCl 0,5 N e aquecido a 30°C por 3 h, para ser hidrolisado.

3.4.1.1. Identificação dos produtos do polissacarídeo PS-32 oxidado, reduzido e hidrolisado

3.4.1.1.1. Identificação dos aldeídos por cromatografia em camada delgada

Para identificação dos possíveis aldeídos formados durante a oxidação foi utilizada cromatografia em camada delgada em placa de sílica-gel, com o seguinte sistema de solventes: benzeno-etanol-água-amônia, na proporção de 200:47:15:1 (v/v), sendo descartada a fase inferior do sistema. Como padrões foram utilizados os compostos: formaldeído, gliceraldeído e glicoaldeído. Para revelação, uma solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina foi utilizada. O cromatograma se desenvolveu por 5 horas.

3.4.1.1.2. Identificação dos polióis por cromatografia descendente em papel

Para tanto, foi utilizado papel Whatman N°1, e o sistema de solventes n-butanol-piridina-água na proporção de 6:4:3 (v/v). Como padrões foram aplicados: glicol, glicerol, treitol e eritritol. O cromatograma se

desenvolveu por 25 h e foi revelado com solução de nitrato de prata em acetona e NaOH alcoólico e lavado com tiosulfato de sódio.

3.4.1.1.3. Identificação dos polióis por cromatografia gás - líquida acoplada a espectrometria de massa

Para análises por CGL-EM, o equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, com injetor automático de amostras, marca Shimadzu Co.. A amostra obtida em 3.4.1 foi silanizada com “kit” Sigma para silanização, a temperatura ambiente, por 10 minutos e injetada diretamente. A coluna usada foi a coluna capilar DB-5 de sílica fundida, tipo fase ligada, 50 m x 0,22 mm, a razão de “split” de 1/100, com a seguinte programação de temperatura: 50°C durante os 5 minutos iniciais, e aumento até 130°C, 6°C/minuto. Como gás de arraste, foi usado hélio com um fluxo de 30 mL/minuto. O injetor e a interface tiveram as temperaturas de 250 e 280°C, respectivamente. As análises foram feitas no intervalo de 40 a 600 u.m., com “scans” de 0,5 s, através de impacto eletrônico a 70 eV.

3.4.1.2. Dosagem do ácido fórmico produzido pela oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio

Cem miligramas do polissacarídeo liofilizado foram dissolvidos em 10 mL de água e o pH foi elevado para 6,3 com NaOH 0,01N. A essa mistura foram adicionados 10 mL de solução de periodato de sódio 0,2 M e a solução obtida foi mantida a 5°C por 72 horas, em ausência de luz. A quantidade de ácido fórmico liberado após 3 dias foi determinada por titulação potenciométrica, de acordo com o método de ANDERSON *et al.* (1955).

3.4.2. Metilação do polissacarídeo PS-32

A metilação do polissacarídeo se deu pelo método de HAKOMORI (1964), adaptado por YAMAMOTO *et al.* (1993) que utilizou o íon metilsulfínil de sódio (dmsil Na), sulfóxido de dimetila (DMSO) como solvente e iodeto de metila como agente metilante.

3.4.2.1. Preparo do íon dimsil Na

O íon dimsil Na foi preparado a partir do DMSO e hidreto de sódio, como a seguir: foram adicionados 30 mL de DMSO seco em um frasco contendo 1,5 g de uma suspensão de hidreto de sódio em óleo mineral misturada com 10 mL de éter anidro e então a reação ficou sob uma atmosfera de nitrogênio, em um banho de 50°C por 2-3 horas. Após este período, a solução foi transferida para ampolas de vidro, e fechada sob atmosfera de nitrogênio.

3.4.2.2. Processo de metilação do polissacarídeo PS-32

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, extremamente seco, foi colocada uma amostra (2-5 mg) do polissacarídeo liofilizado, então foram adicionados 3 mL de DMSO seco e a mistura foi deixada sob agitação por 20 minutos à temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio. Foram então adicionados 3 mL do íon dimsil Na, previamente preparado, através de seringa de vidro. Esta mistura permaneceu sob agitação e atmosfera de nitrogênio por 6 horas. Após este período, foi adicionado 1 mL de iodeto de metila para a metilação, e a agitação continuou por 16 horas, à temperatura ambiente. Então, foi adicionada água destilada (1 mL), e o açúcar metilado foi extraído com 4 mL de clorofórmio. A camada de clorofórmio foi lavada com 3 mL de água e então seca sob nitrogênio.

3.4.2.3. Hidrólise do polissacarídeo PS-32 metilado

Dez miligramas do polissacarídeo metilado foram dissolvidas em 2 mL de solução de ácido fórmico 90%, e aquecidas a 100°C por 4 h. Após este período, o solvente foi evaporado a vácuo e o resíduo tratado com ácido trifluoroacético 2 N por 6 horas a 100°C, sendo o solvente novamente evaporado sob pressão reduzida, segundo YAMAMOTO *et al.* (1993).

3.4.2.4. Redução dos açúcares parcialmente metilados

Foram adicionados 10 mg de hidreto de boro e sódio dissolvido em 10 mL de NH₄OH 0,5 M a 50 mg do polissacarídeo metilado hidrolisado e a mistura foi deixada à temperatura ambiente por 1 h. Para retirada do excesso de hidreto de boro e sódio, foram adicionados 1,5 mL de ácido acético concentrado. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida a 35°C e a

remoção do borato se deu por codestilação a vácuo com 3 porções (2 mL) de metanol a 35°C, segundo ALBERSHEIM *et al.* (1967).

3.4.2.5. Acetilação dos alditóis parcialmente metilados

A 2 mg dos alditóis parcialmente metilados foi adicionado 1 mL da solução de anidrido acético:piridina, 1:1, (v/v) e a mistura foi deixada em estufa a 100°C por 1 h. O excesso de reagente foi removido por codestilação a vácuo com tolueno. Foram então adicionados ao resíduo, 5 mL de CH₂Cl₂ e este foi lavado com 3 porções (1 mL) de água. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida a 35°C, como descrito por YAMAMOTO *et al.* (1993).

3.4.3. Análise dos alditóis acetilados parcialmente metilados, por cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massas

Para análises por CGL-EM, o equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, com injetor automático de amostras, marca Shimadzu Co.. As amostras foram diluídas em diclorometano e injetadas diretamente. A coluna usada foi a coluna capilar DB-5 de sílica fundida, tipo fase ligada, 50 m x 0,22 mm, a razão de “split” de 1/100, com a seguinte programação de temperatura: 130°C nos 5 minutos iniciais e aumento de 7°C/minuto até 300°C, e como gás de arraste, hélio com um fluxo de 30 mL/minuto. O injetor e a interface tiveram as temperaturas de 250 e 280°C, respectivamente. As análises foram feitas no intervalo de 40 a 600 u.m., com “scans” de 0,5 s, através de impacto eletrônico a 70 eV.

3.5. Análise do polissacarídeo PS-32 por espectrometria na região do infravermelho

Para tal análise, foi utilizado 1 mg do polissacarídeo seco, colocado em pastilhas de KBr. O aparelho foi inicialmente calibrado com nujol. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro Perkin-Elmer, 16PC, FT-IR, com transformada de Fourier automática.

3.6. Análise do polissacarídeo PS-32 por espectrometria de ressonância nuclear magnética de ^1H e de ^{13}C

3.6.1. Preparo da amostra de polissacarídeo para análises em RMN de ^1H e de ^{13}C

Para tais análises, o polissacarídeo foi hidrolisado por 16 h, como descrito em 3.3.1.2 e silanizado com “kit” de silanização Sigma.

3.6.2. Análise em RMN de ^1H e de ^{13}C

Os espectros de RMN foram gravados em 300 MHz (^1H) e 75,6 MHz (^{13}C), com transformada de Fourier em memória de 16K. Uma amostra de 5 mg do polissacarídeo parcialmente hidrolisado foi dissolvida em 850 microlitros de D₂O e transferida para microcélula de 12 mm. Os espectros foram obtidos a 70°C, os desvios químicos expressos em ppm ou delta e relativos a um padrão de TMS. Foi utilizado o Espectrômetro General Electric QE 300 acoplado à estação de tratamento de dados Machintosh II.

3.7. Determinação do desvio do sentido da luz polarizada do polissacarídeo PS-32

Foi preparada uma solução 0,01% do polissacarídeo, sendo então filtrada em membrana Millipore (0,45 μm de poro), para clarificação total da amostra. A medida do desvio do sentido da luz polarizada (sódio, $D=589,3\text{ nm}$) foi feita no polarímetro fotoelétrico de precisão, 0,005°, Carl Zeiss, a 20°C.

4. RESULTADOS

4.1. Testes Preliminares

Os resultados dos testes iniciais realizados no polissacarídeo PS-32 foram:

Prova de Fehling (inicial)	positiva
Teste de Biureto (inicial)	positivo

4.1.1. Presença de proteínas

Como inicialmente o Teste de Biureto confirmou a presença de proteínas na amostra de polissacarídeo PS-32, foi feita a purificação enzimática de sua solução com o objetivo de se obter uma amostra de polissacarídeo sem proteínas, que seria posteriormente usado nas análises.

As condições definitivas para a proteólise com papaína, visando a obtenção do polissacarídeo purificado, se deram após vários testes realizados para verificação da concentração da solução de papaína e tempo de hidrólise ideais. Este processo foi considerado bem sucedido e a realização de um novo Teste de Biureto na amostra tratada forneceu resultado negativo.

4.1.2. Presença de açúcares redutores

Como foi notada a presença de açúcares redutores na solução aquosa do polissacarídeo PS-32, foi feita a diálise desta solução por 48 h contra água destilada a 4°C, e em seguida por 24 h, contra água desionizada a 5°C. A Prova de Fehling foi então refeita, com resultado negativo.

Após estes resultados, a amostra do polissacarídeo foi considerada em condições de ser analisada.

4.1.3. Outros testes

Umidade	6,9%
Cinzas	0,51%
Presença de ácidos urônicos	negativa
Presença de piruvato	negativa
Presença de grupos acetila	negativa

4.2. Determinação e quantificação dos monossacarídeos componentes do polissacarídeo PS-32 por CLAE

A hidrólise do polissacarídeo PS-32 com HCl não foi satisfatória, resultando em degradação dos produtos da hidrólise, sendo impossível sua identificação e quantificação. Já a hidrólise do polissacarídeo PS-32 com TFA forneceu produtos de hidrólise distintos e facilmente separáveis por análises em CLAE, existindo a vantagem de após a hidrólise, o ácido ser facilmente removido por evaporação sob nitrogênio seco, evitando a adição de produtos alcalinos para a neutralização do meio e permitindo a concentração imediata da amostra. Na Figura 16 é possível verificar o cromatograma obtido por CLAE da amostra do polissacarídeo PS-32 hidrolisado com TFA por 16 h. Podem ser observados os tempos de retenção para os açúcares que foram de 13,845 min (glucose), 15,752 min (galactose) e 17,302 min (fucose), e ainda a quantificação de cada açúcar, que apresentou a proporção de 3:1:3, respectivamente, glucose, galactose e fucose. Para a quantificação dos açúcares foram utilizadas as curvas de calibração construídas a partir de padrões externos de soluções dos açúcares glucose, galactose e fucose nas concentrações de 5000, 3000 e 1000 ppm para cada açúcar (Figuras 17 e 18).

A identificação dos açúcares através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões, foi posteriormente confirmada por cromatografia gás-líquida-espectrometria de massa (Figuras 32-35).

4.3. Determinação das posições das ligações glicosídicas dos monossacarídeos constituintes do polissacarídeo PS-32

Para a determinação das posições das ligações glicosídicas nas quais os resíduos dos açúcares constituintes do polissacarídeo PS-32 estavam envolvidos, foram utilizadas as técnicas de oxidação do polissacarídeo com periodato, tendo sido analisados os produtos desta oxidação e também a derivação do polissacarídeo com formação de alditóis acetilados parcialmente metilados, que foram posteriormente analisados por CGL-EM.

4.3.1. Resultados da oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio

Após a oxidação, redução e hidrólise do polissacarídeo PS-32, os produtos destas reações foram analisados quanto à presença de aldeídos,

polióis e resíduos intactos dos açúcares, ou seja, resíduos que não sofreram oxidação.

4.3.1.1. Identificação dos produtos do polissacarídeo PS-32 oxidado, reduzido e hidrolisado

4.3.1.1.1. Identificação dos aldeídos por cromatografia em camada delgada

Os possíveis aldeídos presentes entre os produtos de degradação do polissacarídeo PS-32 foram separados e identificados por cromatografia em placas de sílica-gel. Por comparação dos Rf do produto com os Rf de compostos padrão (formaldeído, gliceraldeído e glicolaldeído), foi identificado o glicolaldeído como o único aldeído presente.

4.3.1.1.2. Identificação dos polióis por cromatografia descendente em papel

Os possíveis polióis presentes entre os produtos de degradação do polissacarídeo PS-32 foram separados e identificados por cromatografia ascendente em papel. Por comparação dos Rf dos compostos de hidrólise com os Rf dos compostos padrão (glicol, glicerol, treitol e eritritol) foram identificados glicerol, eritritol e treitol como os polióis presentes.

4.3.1.1.3. Identificação dos polióis por cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa

Através da CGL-EM foi possível obter a identificação dos seguintes compostos silanizados: eritritol, treitol e 1,2,3-butanotriol. Os polióis eritritol (proveniente das unidades de glucose) e treitol (proveniente das unidades de galactose) foram separados por diferenças nos tempos de retenção, identificados através de padrões e pelos espectros de massa. Já o composto 1,2,3-butanotriol (proveniente das unidades de fucose) foi identificado pelo espectro de massa, pois não foi possível a obtenção deste composto padrão para ser aplicado na GCL. Na Figura 19 é possível observar no cromatograma obtido por CGL, os picos dos três compostos eritritol, treitol e 1,2,3-butanotriol. As Figuras 20, 21 mostram os cromatogramas dos padrões de eritritol e treitol e as Figuras 22, 23 e 24 mostram os espectros de massa obtidos para estes compostos.

4.3.1.1.4. Identificação dos monossacarídeos recuperados na oxidação com periodato de sódio

A identificação dos monossacarídeos que não sofreram oxidação com periodato de sódio foi feita por cromatografia descendente em papel, sendo possível verificar que não houveram resíduos de glucose, fucose e galactose intactos, ou seja, todos os resíduos de açúcares possuíam hidroxilas vicinais e foram oxidados pelo periodato.

4.3.1.2. Dosagem do ácido fórmico produzido pela oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio

A quantidade de ácido fórmico liberado após 72 horas de oxidação foi determinada por titulação potenciométrica e o resultado obtido foi de 1 mol de ácido fórmico por unidade básica do polissacarídeo PS-32.

4.3.2. Análise dos alditóis acetilados parcialmente metilados para localização das ligações glicosídicas dos resíduos do polissacarídeo PS-32 por cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa

Visando obter a confirmação da identificação dos monossacarídeos e informações sobre as posições das ligações glicosídicas dos açúcares constituintes do polissacarídeo PS-32, foi feita a derivação do mesmo. O polissacarídeo PS-32 intacto, foi submetido à metilação, tendo todos os seus grupos hidroxílicos livres metilados. Posteriormente, foram feitas hidrólises consecutivas do polissacarídeo metilado, com ácido fórmico e com TFA, para liberação dos resíduos de açúcares parcialmente metilados. Estas hidrólises tornaram possível a exposição dos grupos hidroxílicos que faziam parte das ligações glicosídicas. Procedeu-se então a redução dos resíduos, transformando-os nas suas formas acíclicas, e foi feita a acetilação de todos os grupos hidroxílicos remanescentes, sendo obtidos os alditóis acetilados parcialmente metilados, que foram analisados por CGL-EM.

A cromatografia gasosa dos alditóis acetilados forneceu os picos mostrados na Figura 25. Tais picos foram tentativamente identificados pela comparação dos seus tempos de retenção com tempos de retenção de compostos padrões, como pode ser verificado na Tabela I e na sequência das Figuras 26-31.

Todos os compostos padrões foram obtidos comercialmente, com exceção da 2,3,4-Me₃-fucose e do 1,5-Ac₂-2,3,4-Me₃-fucitol, que foram obtidos através das reações de metilação e acetilação da fucose padrão. Vale observar que, nos cromatogramas de CGL dos compostos 2,3,4-Me₃-fucose e 1,5-Ac₂-2,3,4-Me₃-fucitol, Figuras 26 e 29, respectivamente, existem mais de um pico para cada composto. Este fato se deu, pois, na reação de metilação ocorre a formação de compostos α e β metilados do mesmo açúcar. Os picos que devem ser considerados como padrão dos compostos em questão se encontram especificados em cada uma das figuras.

Tabela I- Fatores de Retenção dos Alditóis Acetilados

Composto	Fator de Retenção	
	1	2
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1,000	-----
1,5- Ac ₂ -2,3,4,6-Me ₄ -Glc	-----	1,016
1,4,5- Ac ₃ -2,3,6-Me ₃ -Glc	1,183	1,176
2,3,4 - Me ₃ -Fuc	0,930	-----
1,5-Ac ₂ -2,3,4 - Me ₃ -Fuc	0,727	-----
1,4,5-Ac ₃ -2,3, - Me ₂ -Fuc	-----	0,720
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,195	-----
1,5-Ac ₂ -2,3,4,6-Me ₄ -Gal	0,973	-----
1,4,5,6-Ac ₄ -2,3-Me ₂ -Gal	-----	1,191

1: Padrões de açúcares metilados, e alditóis acetilados parcialmente metilados. Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50m x 0,22mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio fluxo total 30mL/minuto.

2: Amostra do polissacarídeo PS-32 metilado, hidrolisado, reduzido e acetilado. Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50m x 0,22mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio fluxo total 30mL/minuto.

Já o espectro de massa obtido para cada alditol acetilado encontrado na amostra de polissacarídeo PS-32 metilada, hidrolisada, reduzida e acetilada (Fig. 32-35) e comentado na Tabela II, foi comparado com espectros de massa dos compostos arquivados na biblioteca Wiley 139.

Tabela II- Fragmentos de massas característicos dos alditóis acetilados dos resíduos de açúcares do polissacarídeo PS-32.

Alditol Acetilado	Fragmentação Principal (<i>m/z</i>)
Fucose 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metilfucitol	43, 101, 117, 127, 129, 143, 159,161, 203, 215, 247
Glucose 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol	43, 57, 71, 87, 101, 113,117, 161, 173, 217, 233
1,5- di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol	43, 59, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
Galactose 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3,-di-O-metilgalactitol	43, 57, 71, 85, 99, 101, 117, 127, 142, 161, 173, 187,201, 261

4.3.2.1. Interpretação dos espectros de massa

4.3.2.1.1. Fucose com ligações nas hidroxilas dos C1 e C4

O espectro de massa do 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metilfucitol (P.M. 320 u.m.), (Figura 32) apresentou o pico base característico *m/z* 43 u.m. ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$). O fragmento com *m/z* 247 u.m., representou a fragmentação primária entre o C1 acetoxilado e o C2 metoxilado e por fragmentação secundária deu origem ao *m/z* 215 u.m. devido à perda de metanol (-32). A fragmentação primária entre o C2 metoxilado e o C3 metoxilado originou dois fragmentos possíveis de se observar: o *m/z* 117 u.m. e o *m/z* 203 u.m.. Por β -eliminação de ácido acético (-60) o *m/z* 203 u.m. originou o fragmento secundário *m/z* 143 u.m.. A fragmentação primária entre o C3 metoxilado e o C4 acetoxilado formou o *m/z* 161 u.m., que por β -eliminação de ácido acético (-60), originou o *m/z* 101 u.m., e por liberação do metanol (-32) originou o *m/z* 129 u.m.. A fragmentação primária entre o C3 metoxilado e o C4 acetoxilado também originou o fragmento com *m/z* 159 u.m. que por fragmentação

secundária (-32, metanol) formou o m/z 127 u.m.. Esta fragmentação pode ser comparada à fragmentação de um 1,4,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,3-di-O-metil desóxi-hexitol, mostrada na Figura 13.

4.3.2.1.2. Glucose terminal com ligação na hidroxila do C1

O 1,5- di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol (P.M. 322 u.m.), (Figura 33) apresentou o pico base característico m/z 43 u.m. ($\text{CH}_3\text{C}^+\text{O}$). O fragmento m/z 205 u.m. representou a fragmentação primária entre os carbonos 2 e 3 metoxilados, sendo que a perda de ácido acético (-60), originou o m/z 145 u.m. como fragmento secundário. Já a clivagem entre os carbonos 3 e 4 metoxilados originou o m/z 161 u.m., que perdeu ácido acético (-60) como fragmentação secundária formando o m/z 101 u.m., que por β -eliminação perdeu o formaldeído (-30) formando o m/z 71 u.m.. O m/z 161 u.m. também deu origem, por β -eliminação do metanol, ao m/z 129 u.m., que perdendo um ceteno ($\text{CH}_2\text{C}^+\text{O}$, -42), formou o m/z 87 u.m.. A clivagem entre os carbonos 4 e 5 originou o m/z 117 u.m., que por fragmentação secundária formou o m/z 72 u.m.. As figuras 1 e 2 mostram as possibilidades de interpretação das fragmentações de um 1,2,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-3,4,6-tri-O-metil-hexitol e de um 1,3,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,4,6-tri-O-metil-hexitol.

4.3.2.1.3. Glucose com ligações nas hidroxilas dos C1 e C4

O 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol (P.M. 350 u.m.), (Figura 34) apresentou o P.M. de 350 u.m. e o pico base característico m/z 43 u.m. ($\text{CH}_3\text{C}^+\text{O}$). A fragmentação primária entre os carbonos 2 e 3 originou o m/z 233 u.m. que por fragmentação secundária originou o m/z 173 u.m. (-60, ácido acético) e este o m/z 113 u.m. pelo mesmo motivo. O m/z 117 u.m. também proveniente da fragmentação primária entre os carbonos 2 e 3 metoxilados originou o m/z 87 u.m. (-30, formaldeído) e este originou o m/z 57 u.m. por perda de formaldeído (-30). O m/z 277 u.m. originou-se da fragmentação primária entre os carbonos 1 e 2 que levou à formação do m/z 217 u.m. por β -eliminação do ácido acético (-60). O m/z 161 u.m. originou-se da fragmentação primária entre os carbonos 3 e 4 e por β -eliminação do ácido acético formou o m/z 101 u.m. que eliminando formaldeído (-30) formou o m/z 71 u.m.. Através da Figura 3 pode-se notar a semelhança entre o espectro de massa obtido pela fragmentação do 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol com o espectro de um 1,4,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,3,6-tri-O-metil-hexitol.

4.3.2.1.4. Galactose com ligações nas hidroxilas dos C1, C4 e C6

O espectro de massa do 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3,-di-O-metilgalactitol (P.M. 378 u.m.), (Figura 35) apresentou o o pico base característico m/z 43 u.m. ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}^+$). A fragmentação primária entre o C2 metoxilado e o C3 metoxilado originou o m/z 261 u.m. que por fragmentação secundária, perdeu ácido acético (-60, β -eliminação) e originou o m/z 201 u.m.. A fragmentação primária entre o C2 metoxilado e o C3 metoxilado também originou o m/z 117 u.m.. Já a fragmentação primária entre o C3 metoxilado e o C4 acetoxilado originou o m/z 161 u.m., que por β -eliminação do ácido acético (-60) formou o m/z 101 u.m.. O m/z 117 u.m. e o m/z 161 u.m. formam o par de diagnóstico da fragmentação deste alditol. Fazendo-se uma comparação com a fragmentação de um 1,4,5,6-tetra-O-acetil-(1-deutério)-2,3-di-O-metil-hexitol (Figura 10) com a fragmentação do 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3,-di-O-metilgalactitol pode-se notar as semelhanças entre os espectros de massa.

4.4. Análise do polissacarídeo PS-32 por espectrometria na região do infravermelho

O espectro no IV do polissacarídeo PS-32, mostrado na Figura 36, mostrou uma banda com intensidade forte em torno de $1.000\text{-}1.100\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença de grupos hidroxílicos, uma banda larga com intensidade forte entre $3.000\text{-}3.500\text{ cm}^{-1}$ indicando que estes grupos hidroxílicos podem estar ligados por pontes de hidrogênio. As bandas com intensidade média em 1.650 e 1.700 cm^{-1} indicam duas regiões distintas para carbonilas. As bandas mais fracas que aparecem entre $750\text{-}961\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de estruturas piranosídicas de β -D-galactose, β -D-glucose e α -L-fucose, segundo BARKER *et al.* (1954).

4.5. Análise do polissacarídeo PS-32 por espectrometria de ressonância nuclear magnética de ^1H e de ^{13}C

4.5.1. Ressonância nuclear magnética de ^1H

O espectro de RMN de ^1H , que pode ser visto na Figura 37, forneceu dados sobre a configuração anomérica dos resíduos de açúcares. O valor 5,02 ppm para L-fucose indica que esta possui configuração α enquanto que os picos a 4,88 e 4,47 ppm referem-se às formas anoméricas da β -D-glucose e da β -D-galactose respectivamente, (ASPINALL *et al.*, 1993).

4.5.2. Ressonância nuclear magnética de ^{13}C

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 38) apresentou picos ao redor de 100 ppm, que indicam a presença de carbonos anoméricos com ligações equatoriais, (GORIN & MAZUREK, 1975).

4.6. Determinação do desvio do sentido da luz polarizada

Através de análises em triplicata da amostra da solução 0,01% de polissacarídeo PS-32, obteve-se o valor médio de $[\alpha]_D = -260^\circ$.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Por hidrólise total do polissacarídeo PS-32 em meio ácido (TFA) e análise do hidrolisado em CLAE, foram obtidos os açúcares glucose, galactose e fucose na proporção de 3:1:3 (Figura 16) que foram posteriormente confirmados na forma de alditóis acetilados por CGL-EM (Figuras 32-35).

A maior frequência na natureza de glucose e galactose na configuração D e fucose na configuração L, o sentido do ângulo de rotação do polissacarídeo para a esquerda ($[\alpha]_D = -260^\circ$) e dados do espectro de infravermelho levaram a propor para a glucose e a galactose a configuração D e para a fucose a configuração L e também propor estruturas piranosídicas para estes açúcares.

Com base nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , foi possível propor que as ligações para a D-galactose e para a D-glucose são β , sendo que a L-fucose se apresenta na configuração α , a qual é mais comum na natureza.

Por oxidação do polissacarídeo PS-32 com periodato de sódio seguida do tratamento com hidreto de boro e sódio e posterior hidrólise foram obtidos: glicaldeído, eritritol, treitol, 1,2,3-butanotriol, glicerol e ácido fórmico. A ausência dos açúcares glucose, galactose e fucose na sua forma intacta indicou que todos os resíduos desses açúcares no polissacarídeo PS-32 se encontravam com grupos hidroxílicos vicinais e que portanto, foram oxidados pelo periodato de sódio.

O ácido fórmico formado, que corresponde a 1 mol por unidade básica do polissacarídeo pode ter sido proveniente dos resíduos terminais não redutores da glucose.

A presença de glucose terminal na forma piranosídica e de glucose ligada pelos C1 e C4 foi comprovada pelos espectros de massa obtidos por separação dos alditóis acetilados parcialmente metilados por cromatografia gasosa. A glucose terminal daria por oxidação, redução e posterior hidrólise, ácido fórmico, glicerol e glicaldeído. O resíduo de glucose ligado em C1 e C4 daria por oxidação, redução e hidrólise, eritritol e glicaldeído.

A ausência de resíduos de glucose, galactose e fucose metilados na posição 5, mostrou que estes açúcares se apresentam na forma piranosídica, o que foi comprovado também pelo espectro de RMN de ^{13}C do polissacarídeo PS-32 onde foi verificado a ausência de sinais no intervalo 80-85 ppm, que é a faixa onde aparecem os deslocamentos químicos de C4 de α e β metilfuranosídeos, (RITCHIE *et al.*, 1975), além da comprovação pelo espectro de IV.

A detecção do 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metilgalactitol confirmada pelo espectro de massa, indicou que o resíduo de galactose estava ligado pelas hidroxilas dos carbonos 6, 4 e 1, já que estes carbonos se encontravam acetoxilados. A presença do glicaldeído e do treitol nos hidrolisados do polissacarídeo PS-32 oxidado confirmaram esta hipótese.

A formação do treitol como composto resultante da oxidação indicou que os grupos hidroxílicos nas posições 2 e 3 da galactopiranosose estão livres e que a posição 4 está comprometida. A presença do glicaldeído dentre estes compostos também indicou que os carbonos 2 e 3 não participavam das ligações glicosídicas. A ausência de unidades de galactose intactas após a hidrólise do oxidado indicou que os carbonos 2 e 3 possuíam hidroxilas livres.

O espectro de RMN de ^{13}C do polissacarídeo PS-32 mostrou que não há picos na região compreendida entre 80 e 98 ppm, portanto, por comparação com o valor do deslocamento químico do C-3 do metil-3-O-metilgalactopiranosídeo que se localizava nesta região (VOELTER & BREITMAIER, 1973), ficou eliminada a possibilidade de ligação em 3 para a galactose.

A presença da fucose na forma piranosídica com ligações nos C1 e C4 foi comprovada pelo espectro de massa obtido do pico do 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metilfucitol, em cromatografia gasosa. Foi observada também a formação do composto 1,2,3 butanotriol, característico da degradação da fucose, por rompimento da ligação entre os carbonos 2 e 3 através de oxidação, significando que estes possuíam hidroxilas livres. A formação do glicaldeído também foi observada no polissacarídeo PS-32 hidrolisado, sugerindo a ligação da fucose pelo carbono 4.

6. CONCLUSÕES

- I. O polissacarídeo PS-32, obtido por fermentação aeróbica da bactéria *Beijerinckia* sp, contém em sua estrutura química somente: D-glucose, D-galactose e L-fucose na seguinte proporção 3:1:3.
- II. As unidades de glucose, galactose e fucose se encontram na forma piranosídica.
- III. Os monossacarídeos glucose e galactose se encontram na forma β , enquanto que a fucose se encontra na forma α .
- IV. A cadeia principal do polissacarídeo PS-32 é constituída por unidades de β -D-galactose e α -L-fucose com ligações glicosídicas 1-4.
- V. A cadeia lateral do polissacarídeo é formada por unidades de β -D-glucopiranoses.
- VI. As unidades de β -D-galactopiranoses se encontram ligadas em 1, 4 e 6.
- VII. As unidades de β -D-glucopiranoses estão ligadas por 1 e 4, na ramificação.
- VIII. Os resíduos terminais não redutores do polissacarídeo PS-32 são constituídos por unidades de β -D-glucopiranosose.
- IX. As unidades de α -L-fucopiranosídeos estão ligadas por 1 e 4, na cadeia principal.

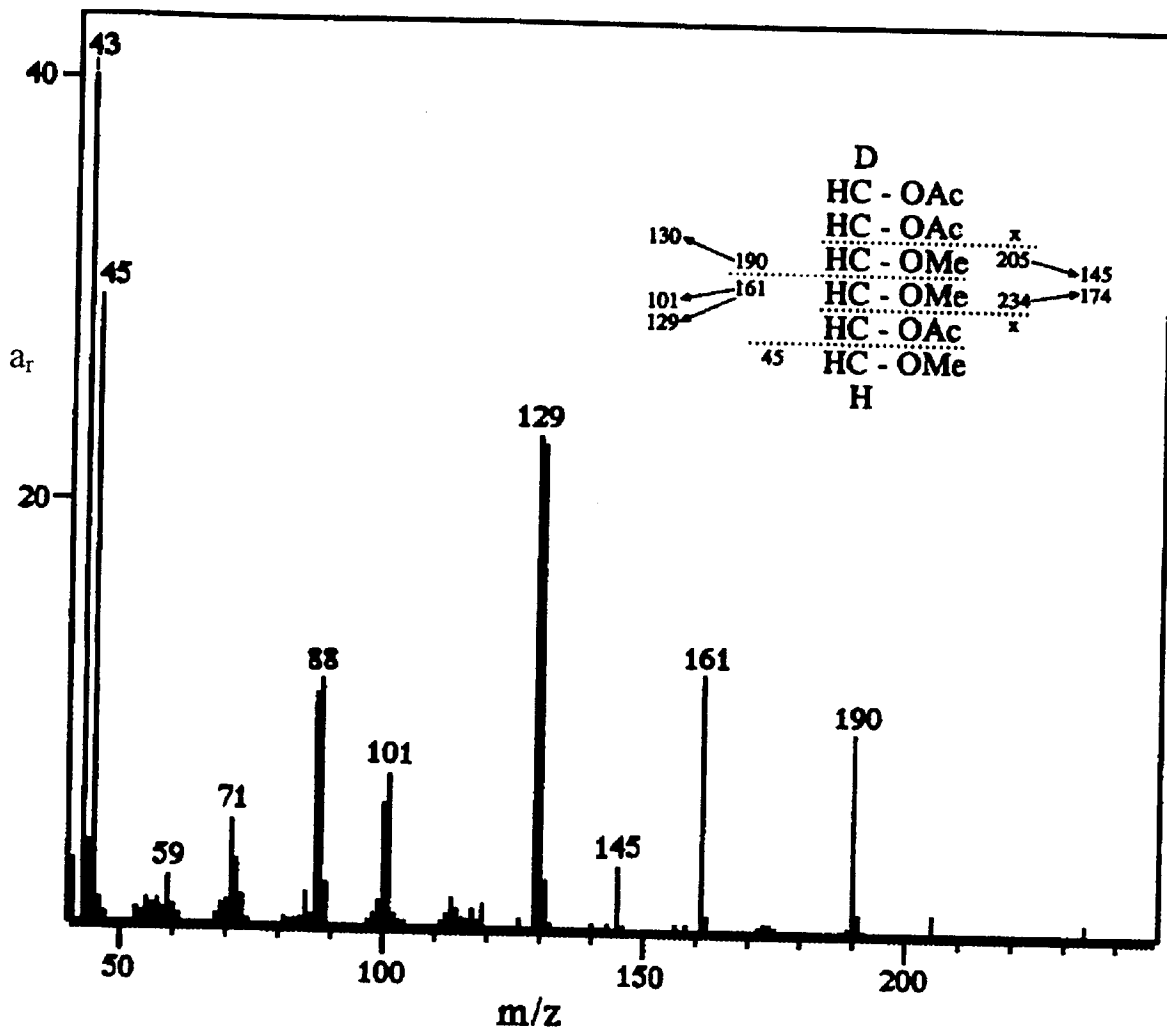


Figura 1- Espectro de massa do 1,2,5,-tri-O-acetil-(1-deutério)-3,4,6-tri-O-metil hexitol

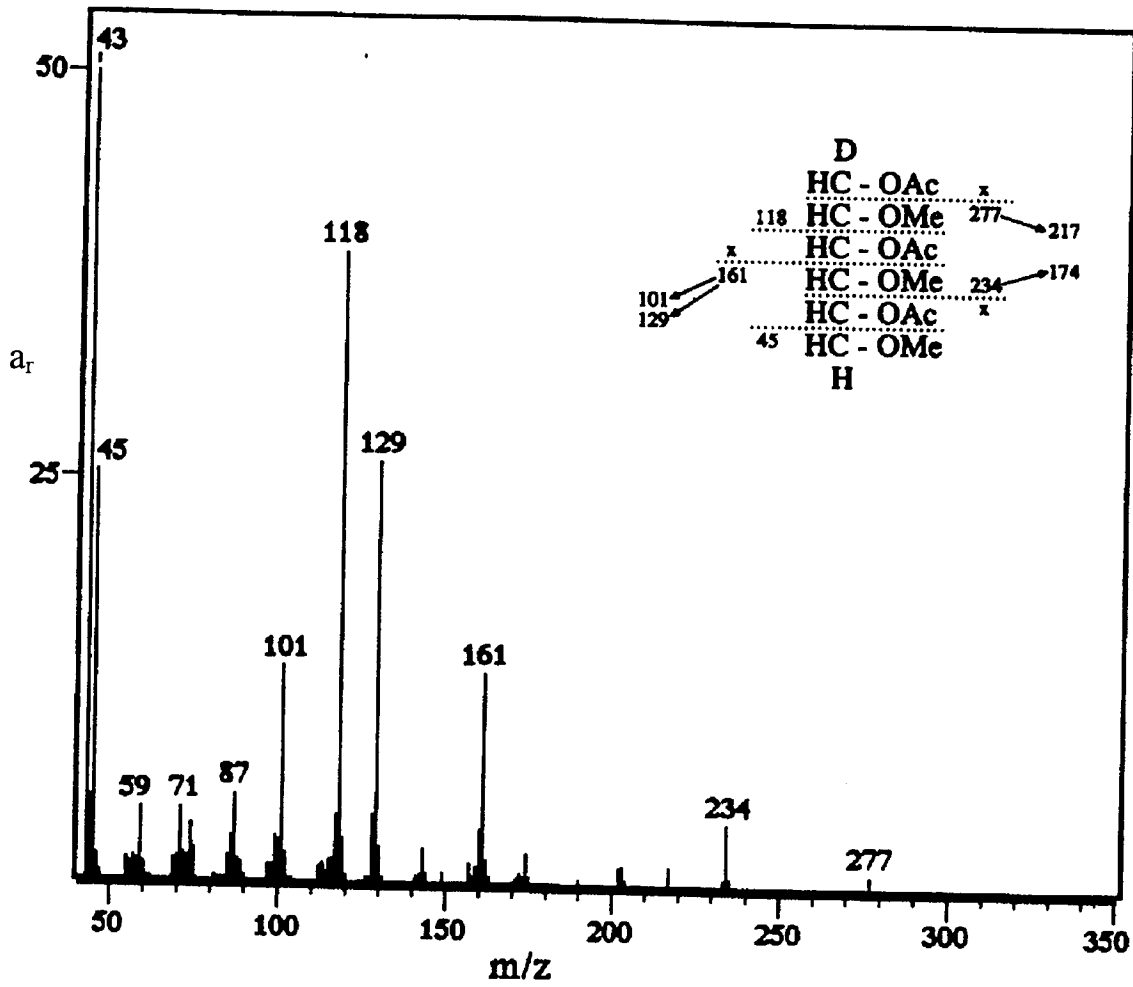


Figura 2- Espectro de massa do 1,3,5,-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,4,6-tri-O-metil hexitol

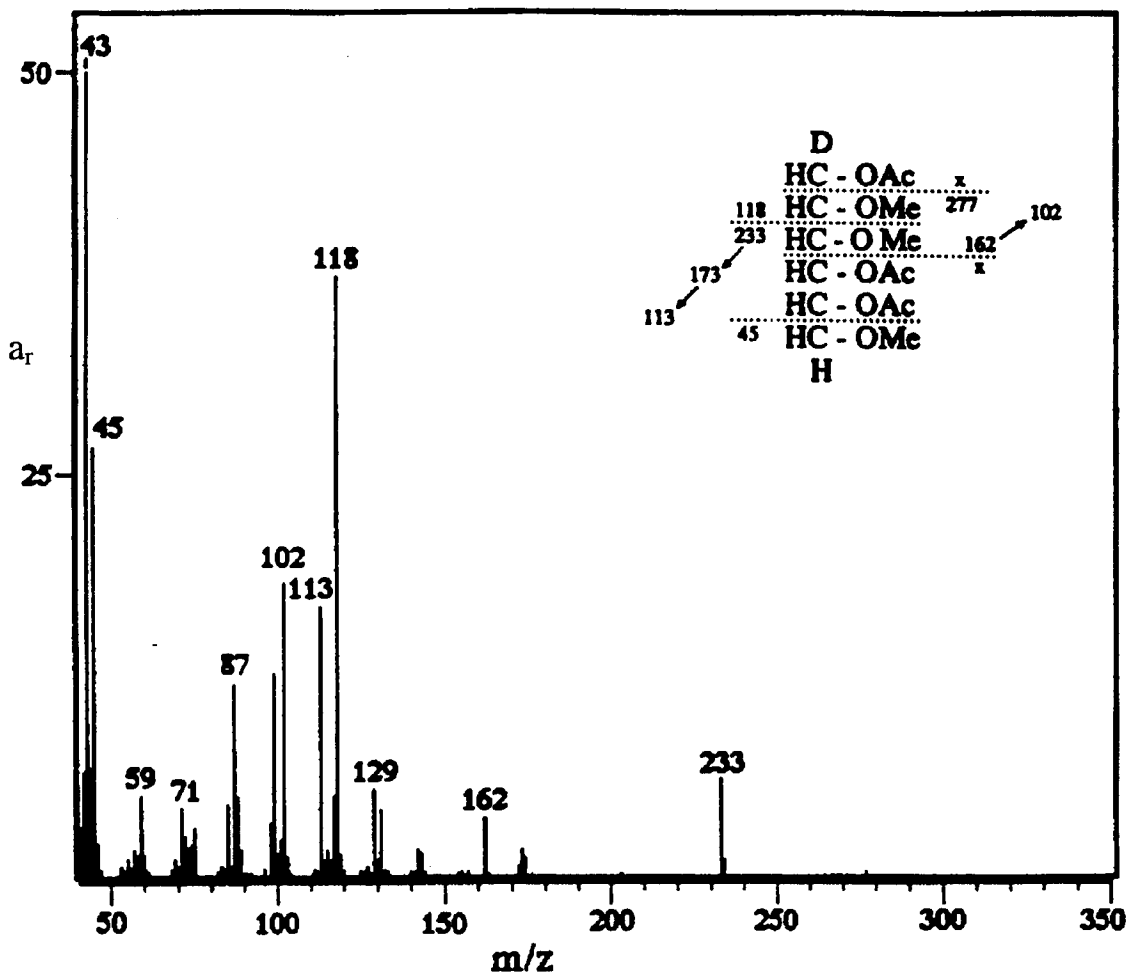


Figura 3- Espectro de massa do 1,4,5,-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,3,6-tri-O-metil hexitol

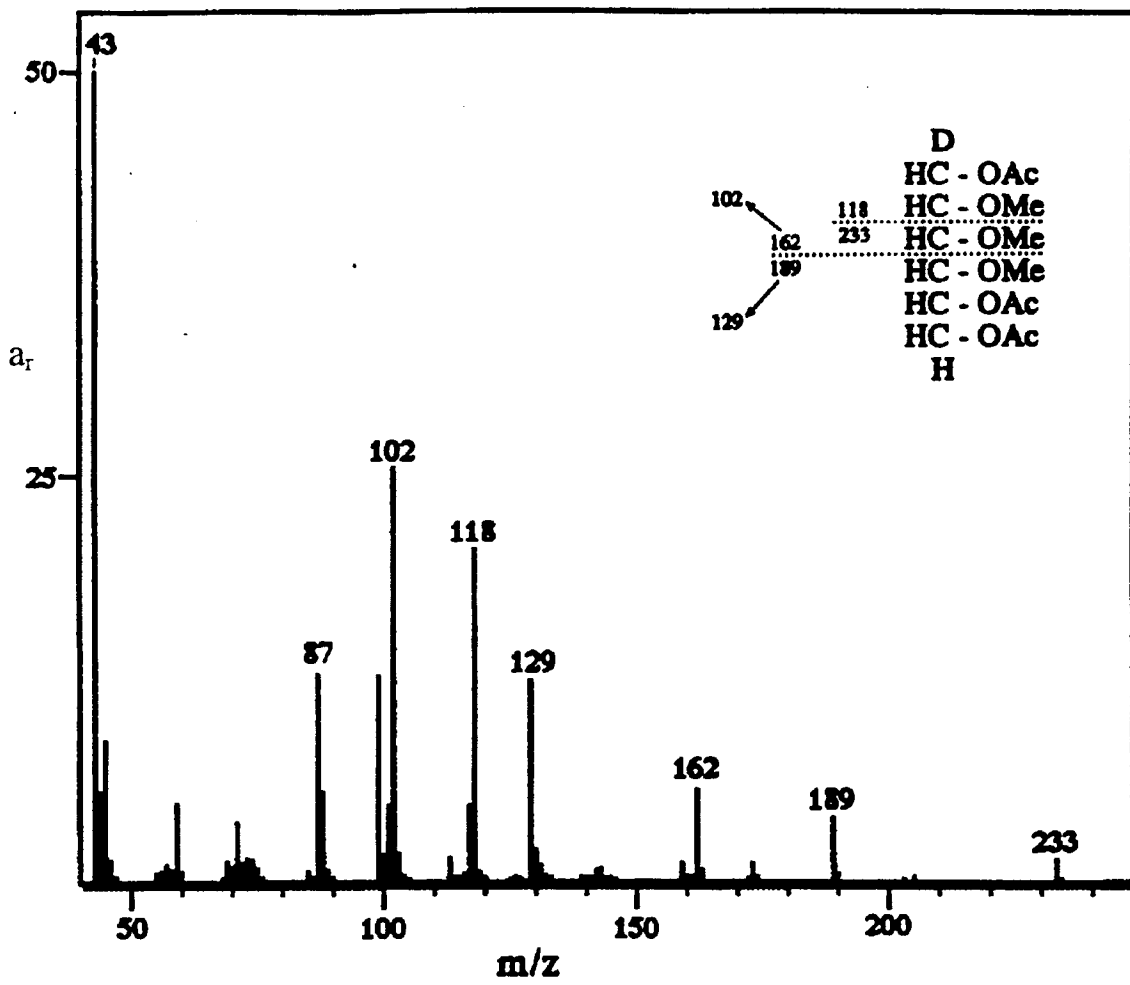


Figura 4- Espectro de massa do 1,5,6-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,3,4-tri-O-metil hexitol

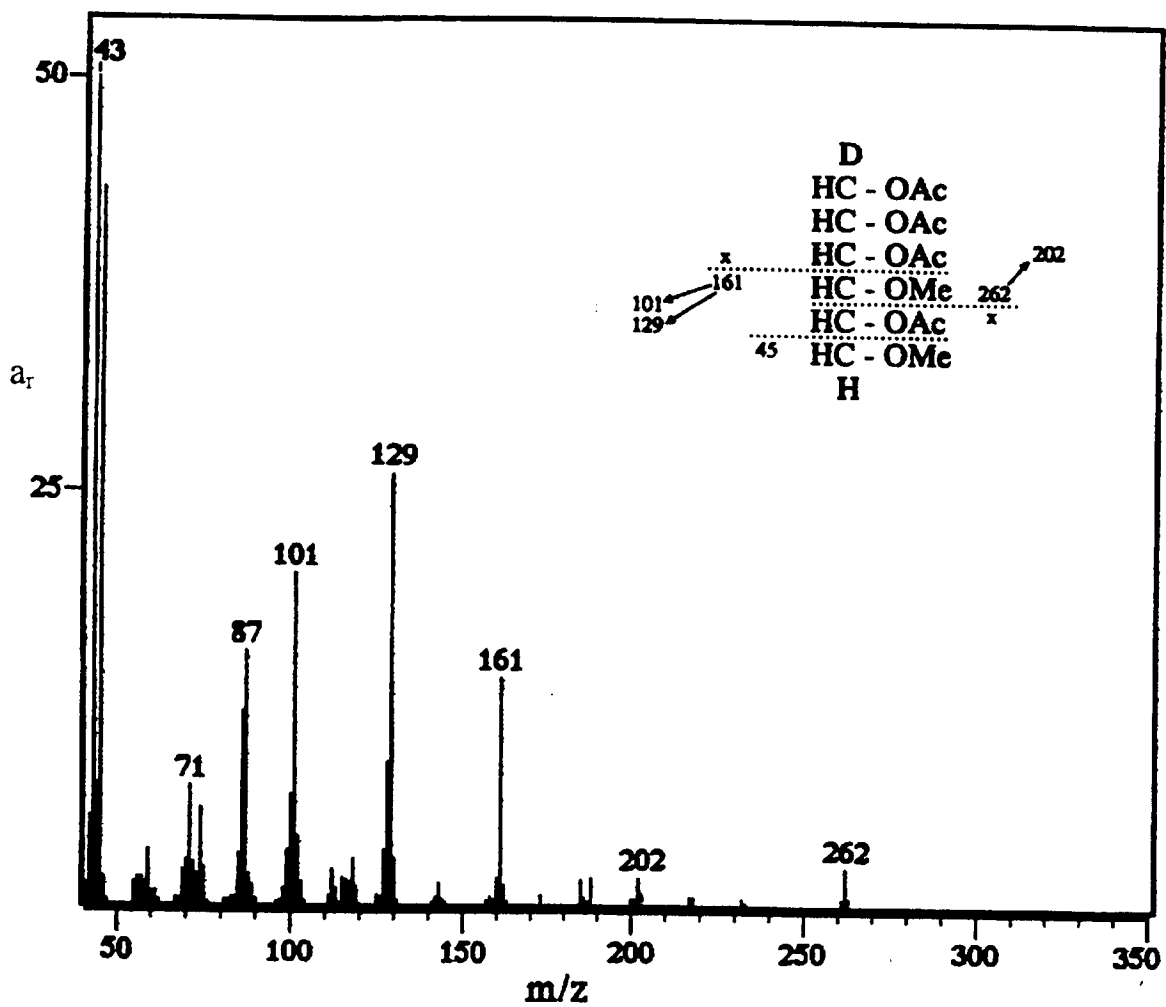


Figura 5- Espectro de massa do 1,2,3,5-tetra-O-acetil-(1-deutério)-4,6-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada

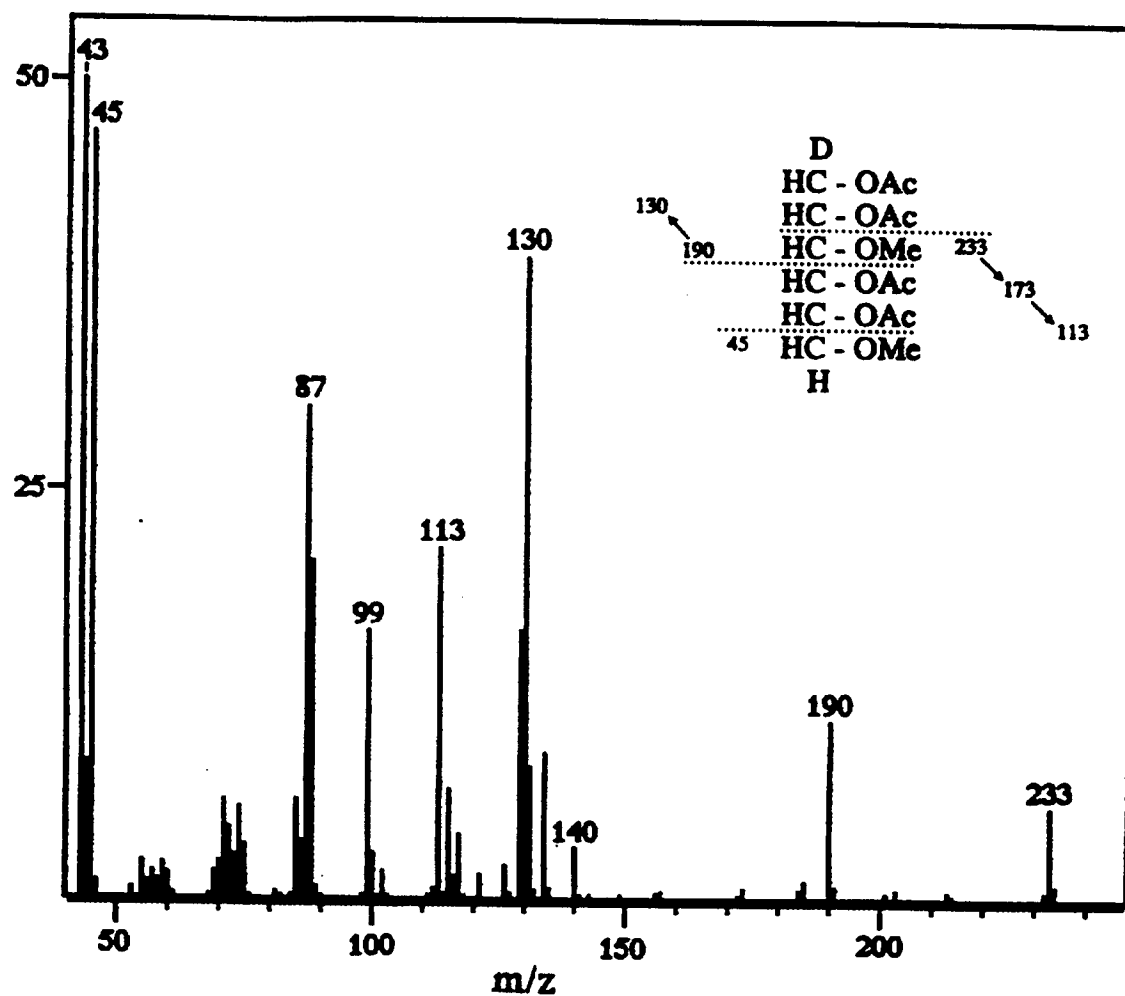


Figura 6- Espectro de massa do 1,2,4,5-tetra-O-acetil-(1-deutério)-3,6-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada

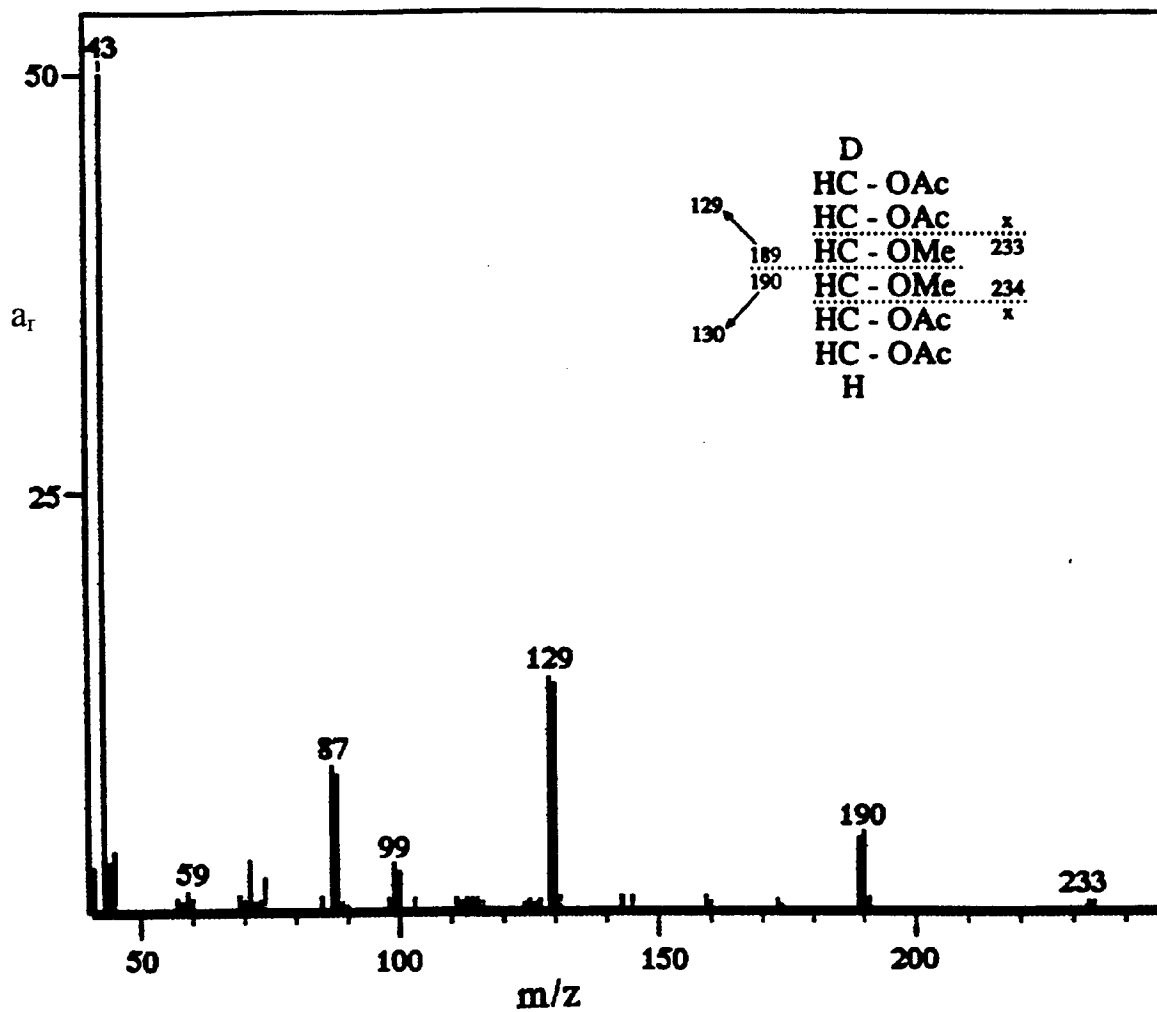


Figura 7- Espectro de massa do 1,2,5,6-tetra-O-acetil-(1-deutério)-3,4-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosse ramificada

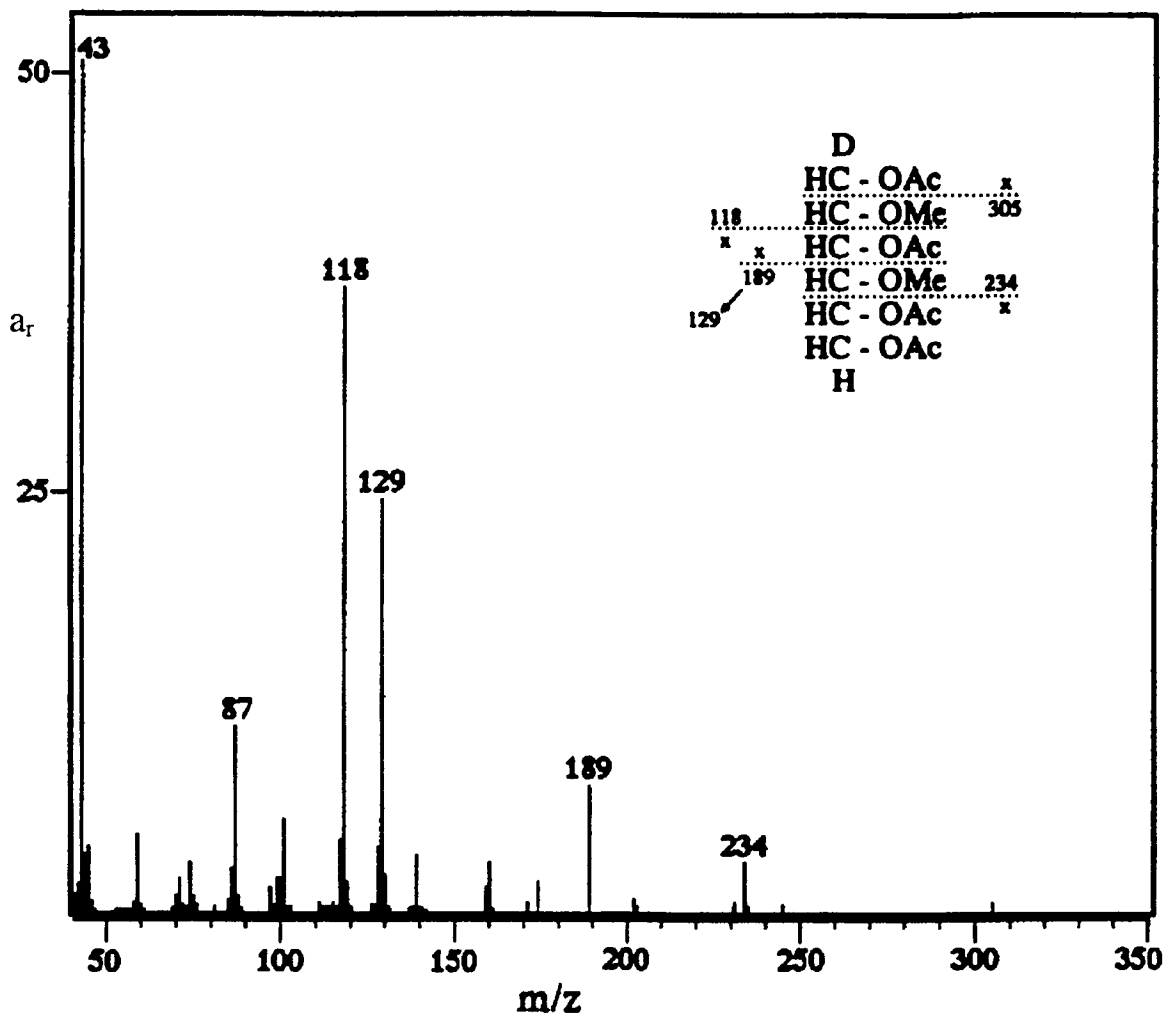


Figura 9- Espectro de massa do 1,3,5,6-tetra-O-acetil-(1-deutério)-2,4-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosose ramificada

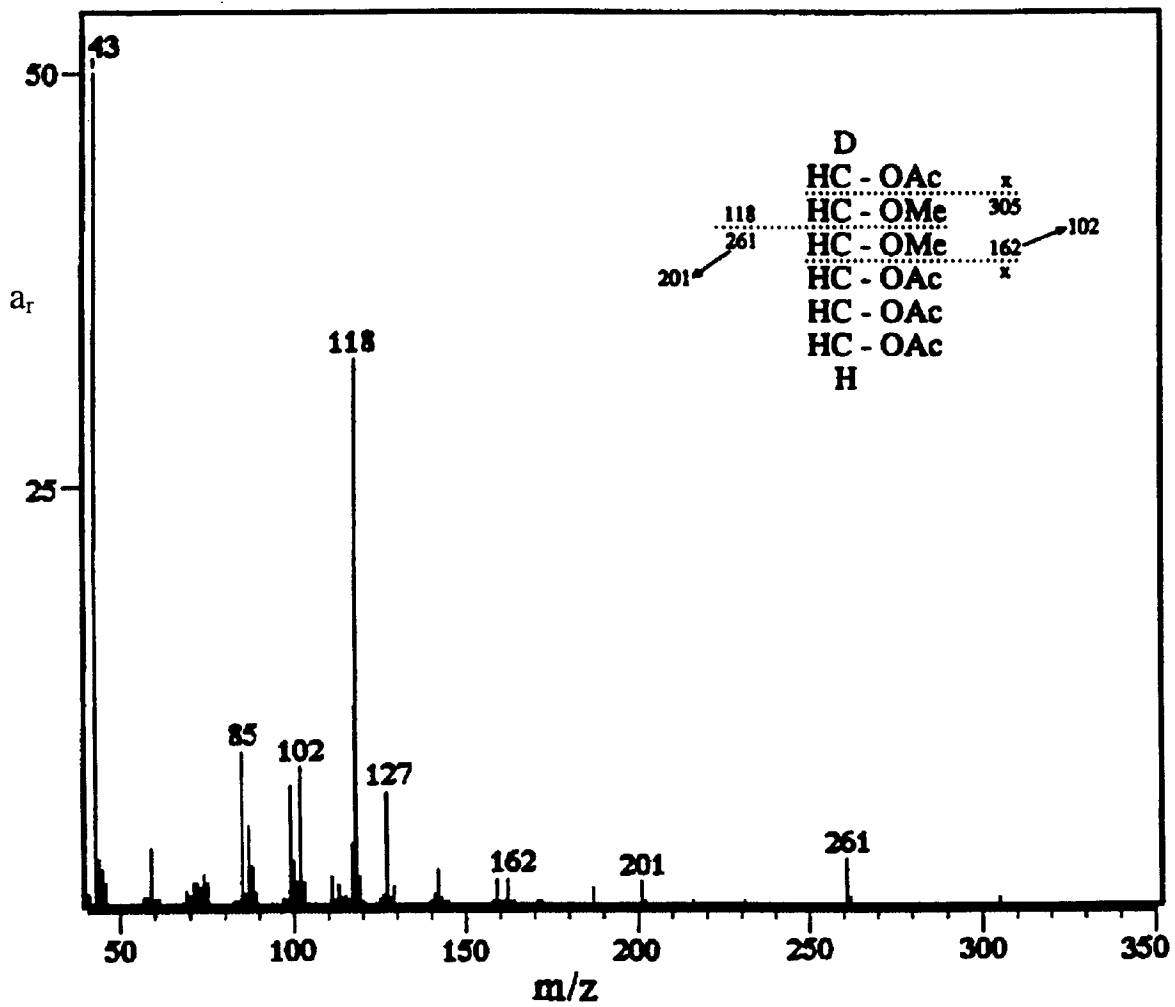


Figura 10- Espectro de massa do 1,4,5,6-tetra-O-acetil-(1-deutério)-2,3-di-O-metil hexitol, proveniente de hexopiranosse ramificada

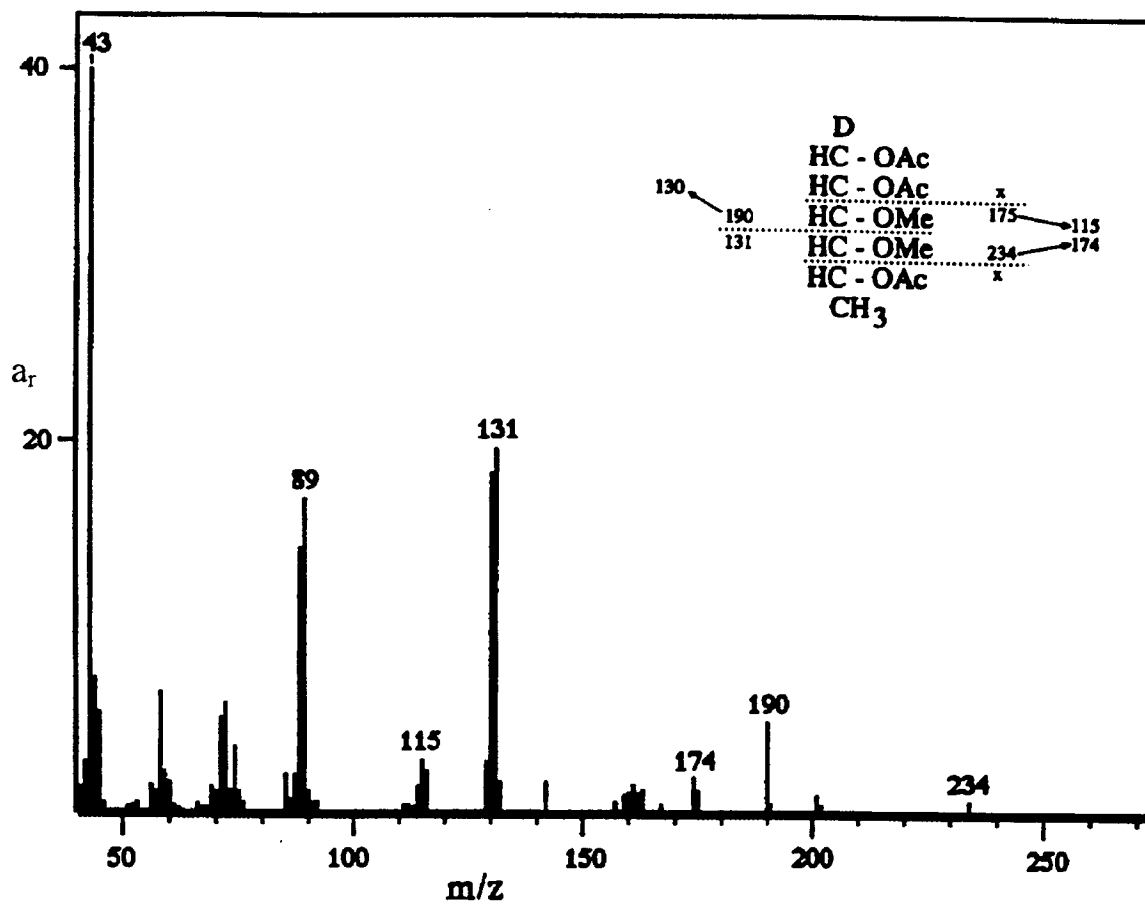


Figura 11- Espectro de massa do 1,2,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-3,4-di-O-metil desoxi-hexitol

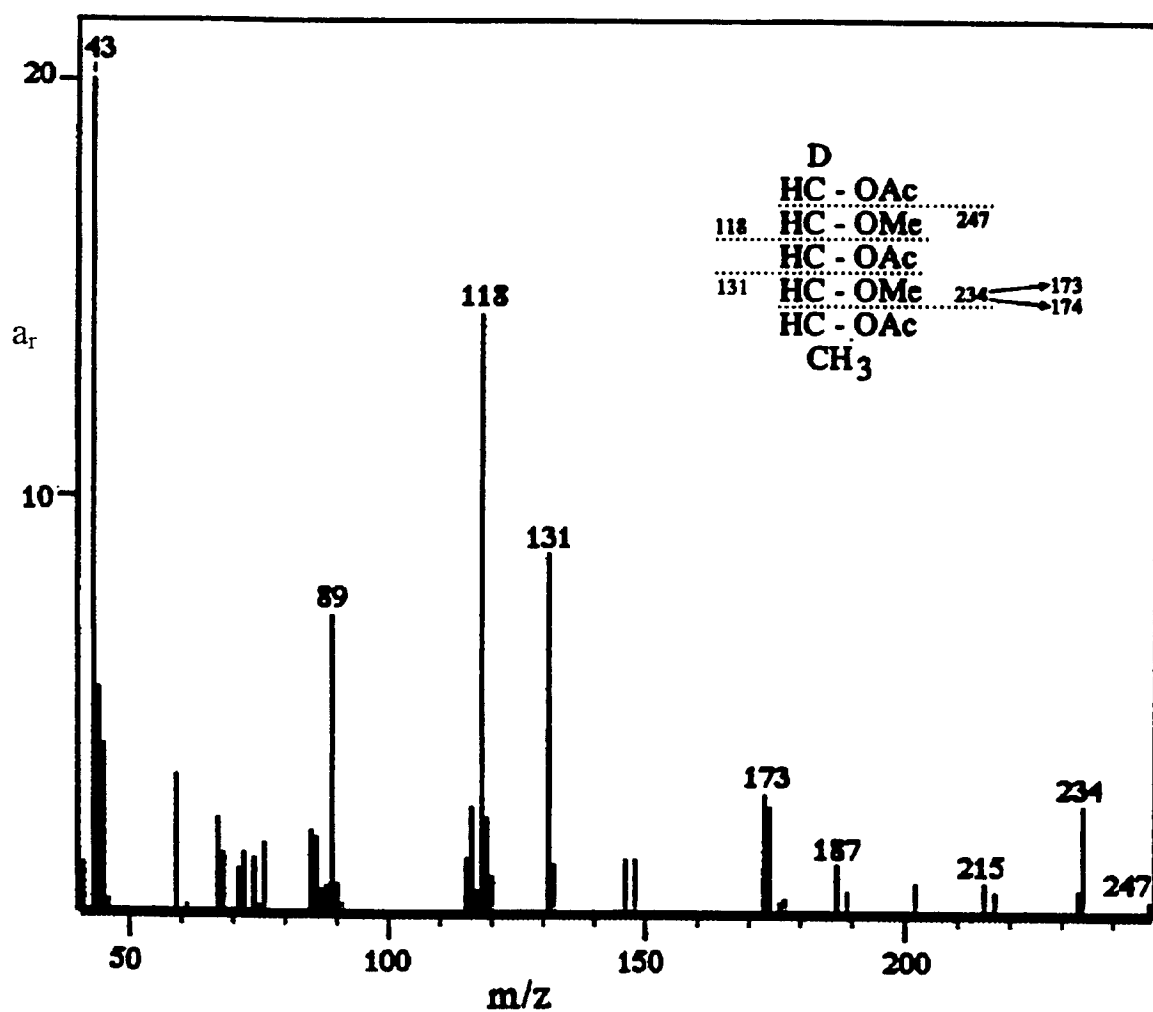


Figura 12- Espectro de massa do 1,3,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,4-di-O-metil desoxi-hexitol

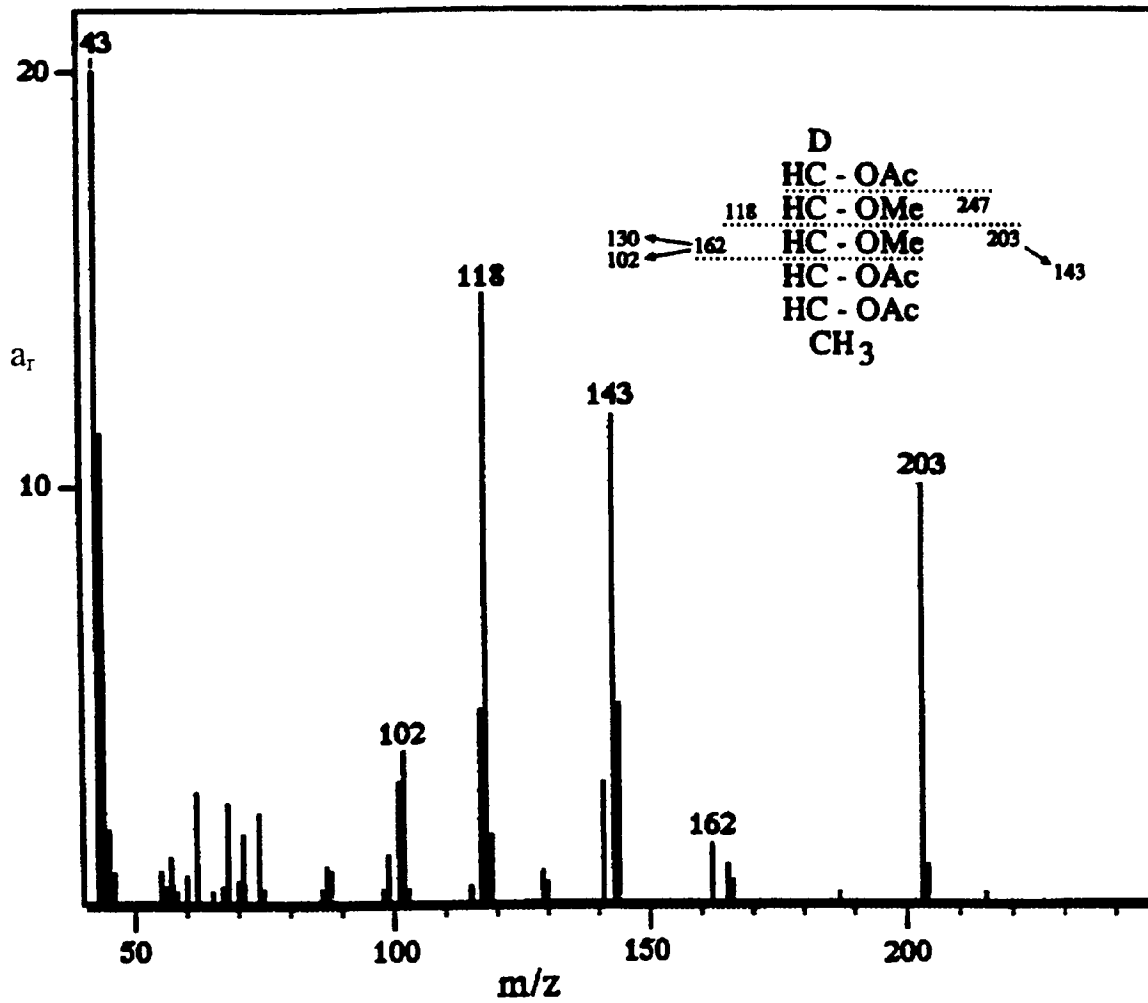


Figura 13- Espectro de massa do 1,4,5-tri-O-acetil-(1-deutério)-2,3-di-O-metil desoxi-hexitol

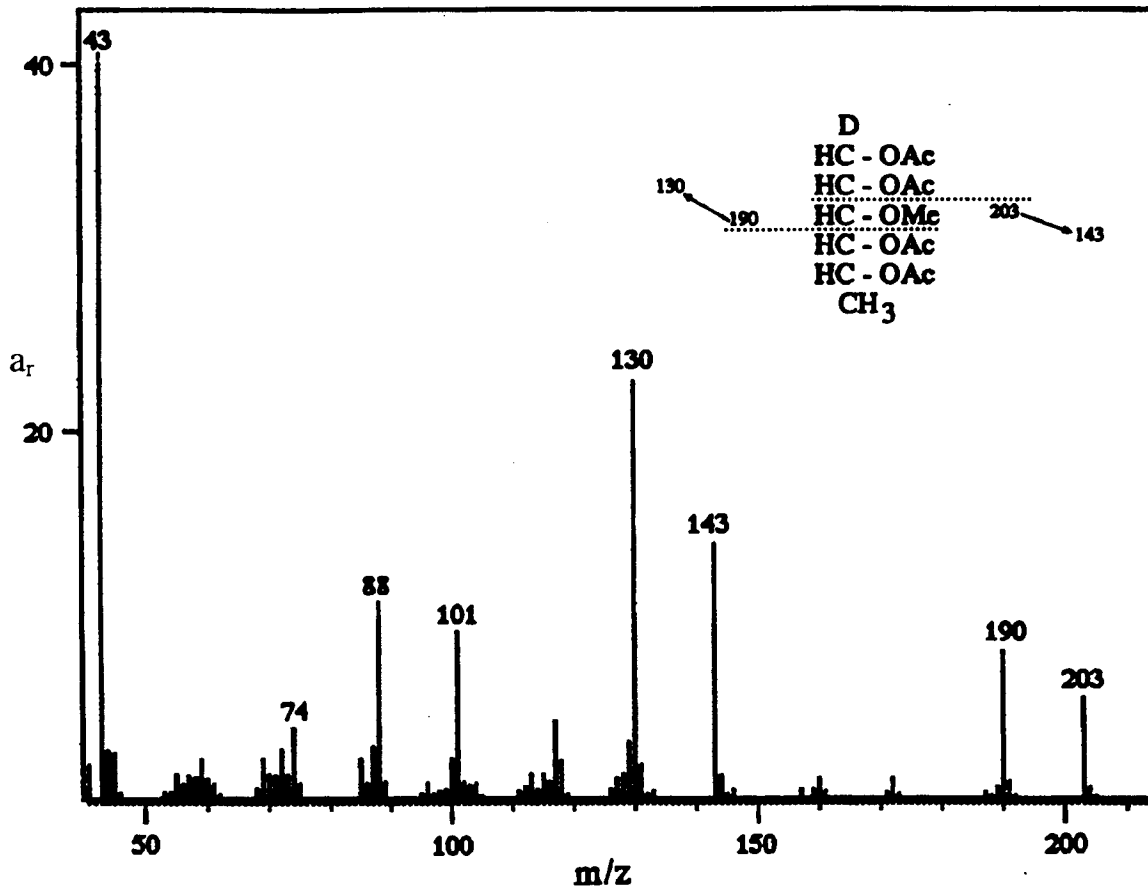
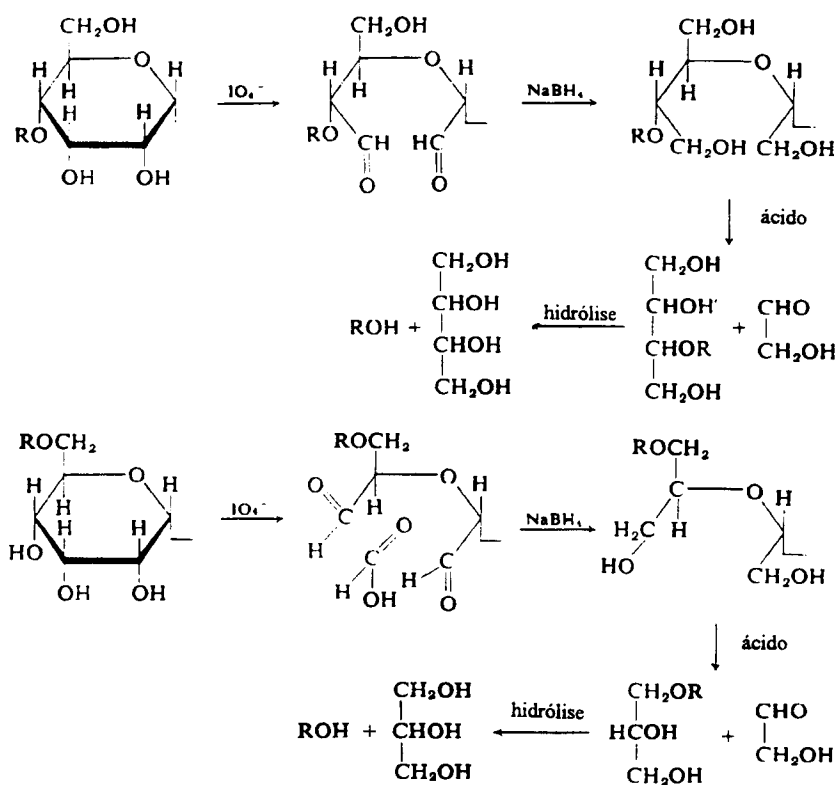
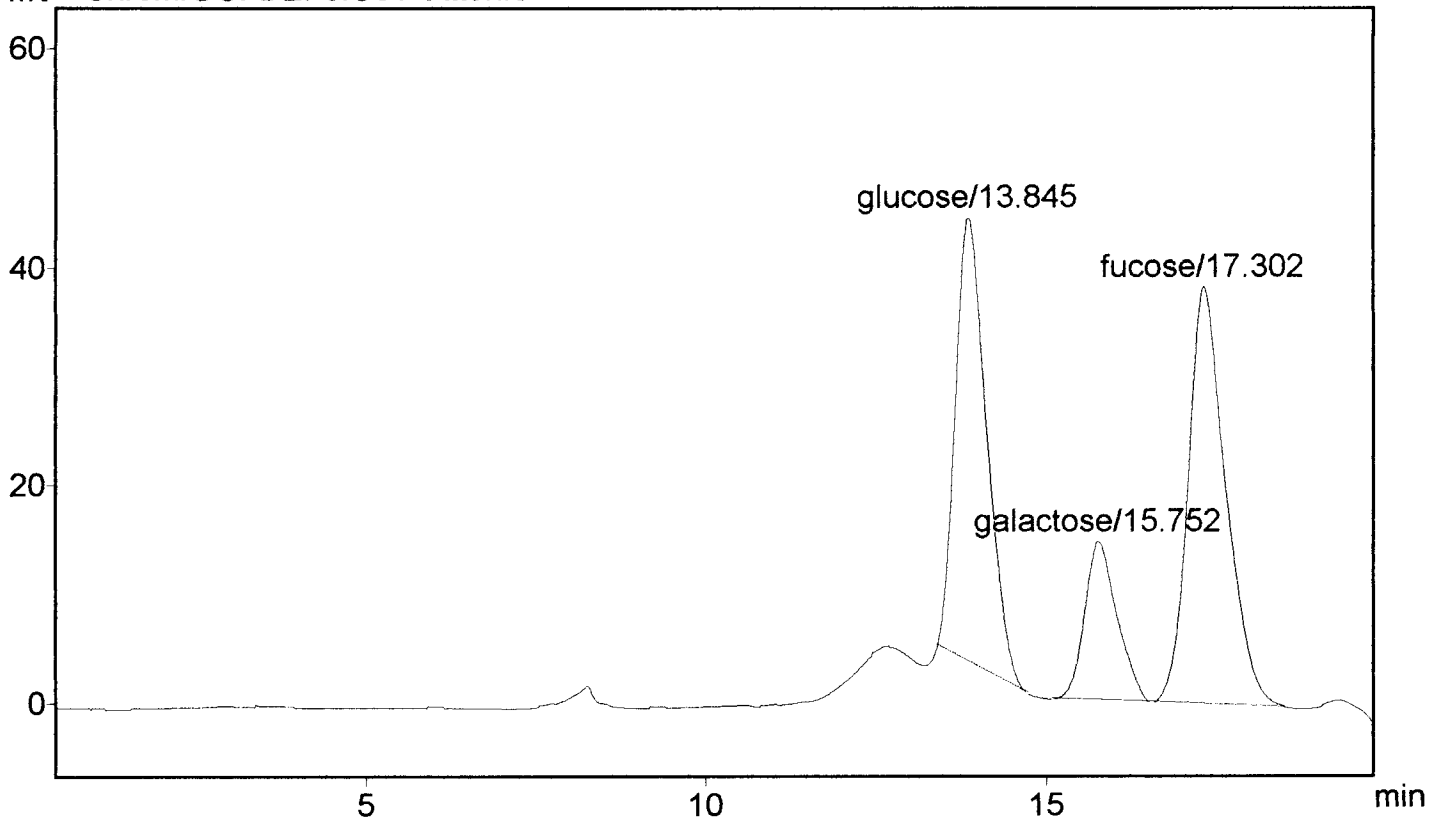


Figura 14- Espectro de massa do 1,2,4,5-tetra-O-acetil-(1-deutério)-3-O-metil desoxi-hexitol



R: Resíduo de açúcar unido por ligação glicosídica

Figura 15- Oxidação de carboidratos com periodato.



PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	13.845	377237	9637	V	1	1007.4462	glucose
2	15.752	153694	5429	V	2	304.1459	galactose
3	17.302	376771	8254	V	3	1069.1879	fucose
-----		-----	-----			-----	
TOTAL		907702	23320			2380.7798	

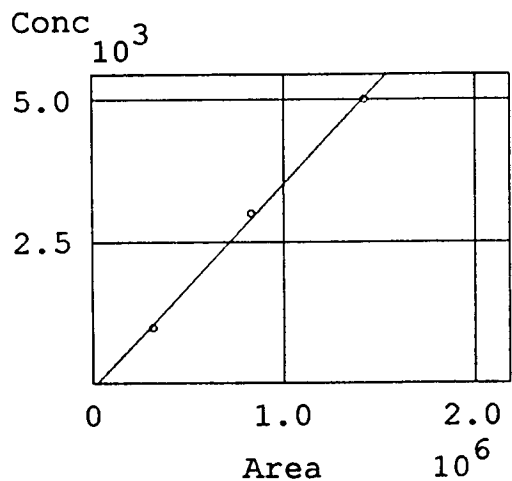
Figura 16- Cromatograma obtido por CLAE dos produtos de hidrólise do polissacarídeo PS-32 com TFA 2N, por 16 horas a 100°C, utilizado para quantificação dos açúcares glucose, galactose e fucose. Os açúcares foram quantificados na relação de 3:1:3, glucose, galactose e fucose, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna de troca iônica SCR-101P, temperatura da coluna 80°C, fase móvel água ultrapura, fluxo de 0,6 mL/min.

*** Calibration Result ***

** ID Table **

IDNO	NAME	TIME	CONC	RF1	RF2
1	glucose	13.82	1000	0.00360643	-87.8672
			3000		
			5000		
2	galactose	15.71	1000	0.00329276	-358.74
			3000		
			5000		
3	fucose	17.30	1000	0.00314704	90.9915
			3000		
			5000		

** Calibration Curve Graph **

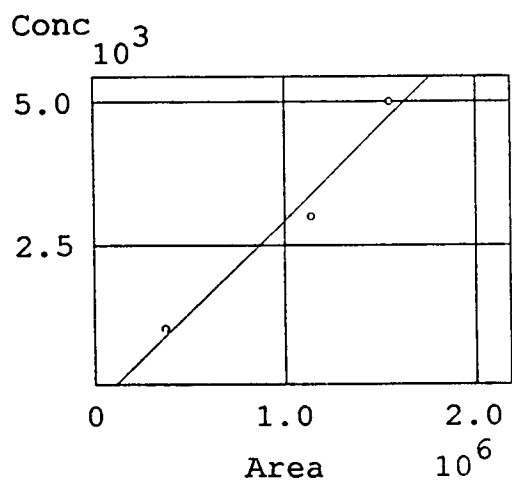


IDNO: 1
 NAME: glucose
 TIME: 13.82

	CONC	AREA
(1)	1000	315918
(2)	3000	829587
(3)	5000	1423127

	RF1	RF2
(1)	0.00360643	-87.8672

r2 = 0.999134



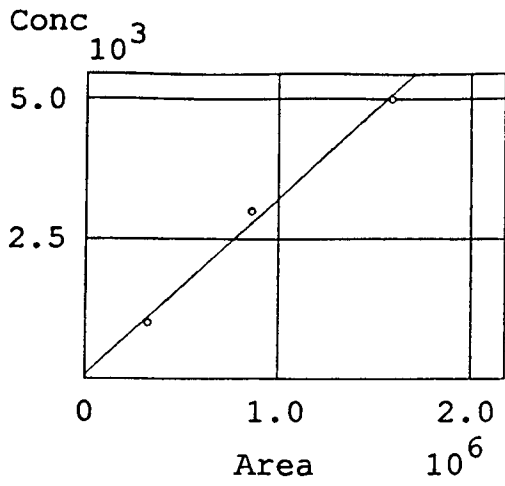
IDNO: 2
 NAME: galactose
 TIME: 15.71

	CONC	AREA
(1)	1000	371240
(2)	3000	1138644
(3)	5000	1550234

	RF1	RF2
(1)	0.00329276	-358.74

r2 = 0.985157

Figura 17- Curvas de Calibração utilizadas para quantificação dos açúcares constituintes do polissacarídeo PS-32.



IDNO: 3
 NAME: fucose
 TIME: 17.3

	CONC	AREA
(1)	1000	325860
(2)	3000	860144
(3)	5000	1587085

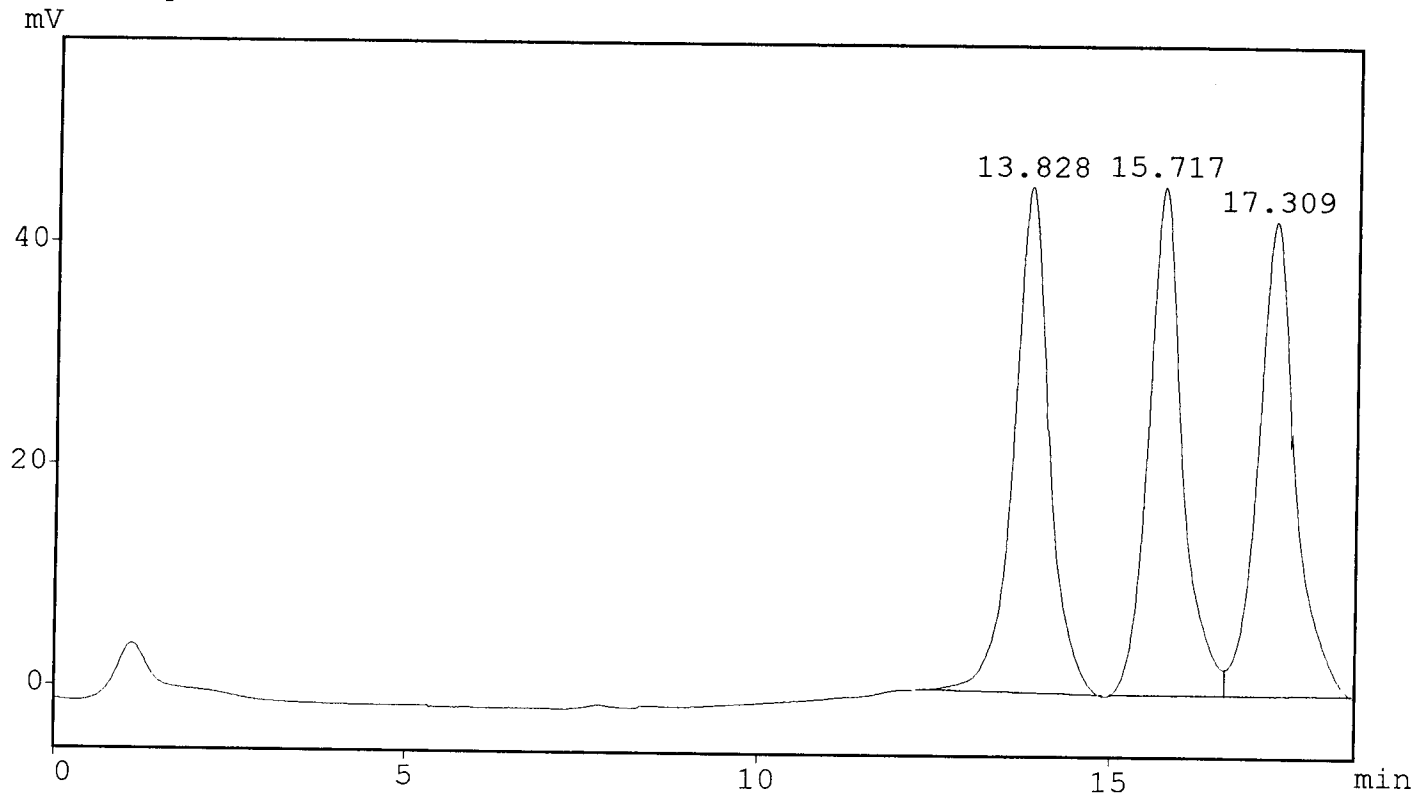
	RF1	RF2
(1)	0.00314704	90.9915

r2 = 0.996134

Continuação da Figura 17.

CLASS-LC10 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=9 DATA=TGGF52.D01 95/12/11 10:21:16
 Sample : ggf35
 ID :
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor: 1
 Type : Unknown
 Detector :
 Operator :

*** Chromatogram ***



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	13.828	1618454	45655		1	4345.1006	glucose
2	15.717	1550234	45905		2	4626.8545	galactose
3	17.309	1587085	42829	V	3	5043.5327	fucose
		4755773	134389			14015.4873	

Figura 18- Cromatograma dos açúcares padrões (C=5000 ppm) usados na construção das Curvas de Calibração. Condições cromatográficas: coluna de troca iônica SCR-101P, temperatura da coluna 80°C, fase móvel água ultrapura, fluxo de 0,6 mL/min.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : TRERISI1.D01 96/01/05 11:32:44
Sample : trerisil
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

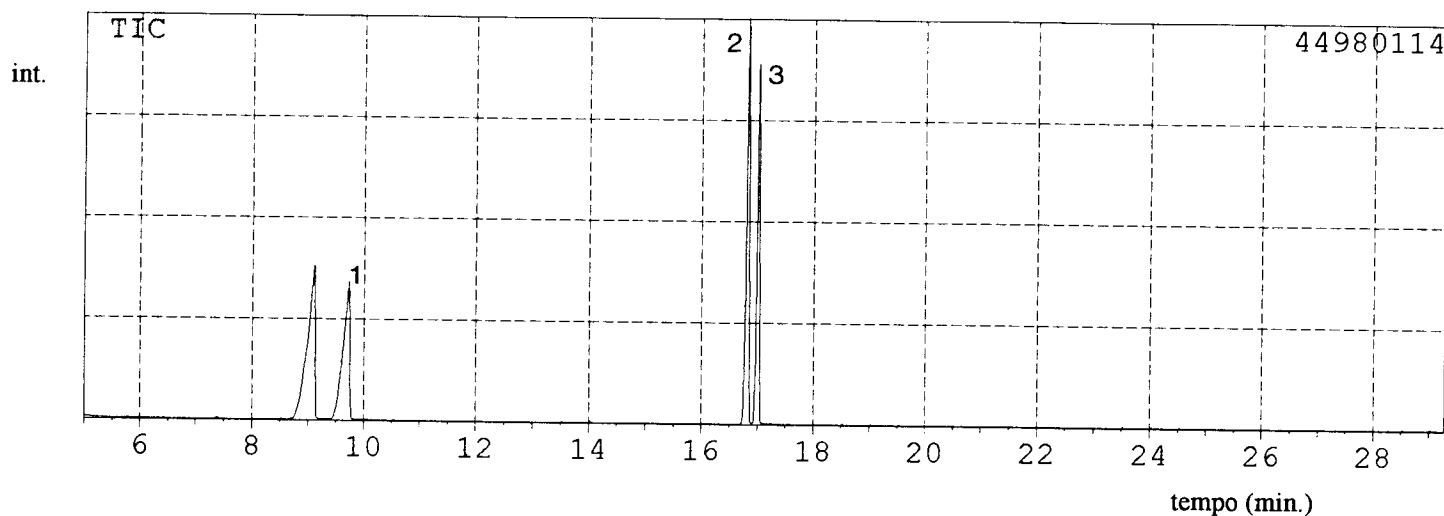


Figura 19- Cromatograma obtido por CGL dos polióis obtidos após oxidação, redução, hidrólise e silanização do polissacarídeo PS-32. Pico 1: 1,2,3-butanotriol; Pico 2: eritritol e Pico 3: treitol. Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 50°C por 5 minutos, e aumento até 130°C, 6°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30 mL/minuto.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : ERISIL2.D01 96/01/04 18:52:44
Sample : erisil
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

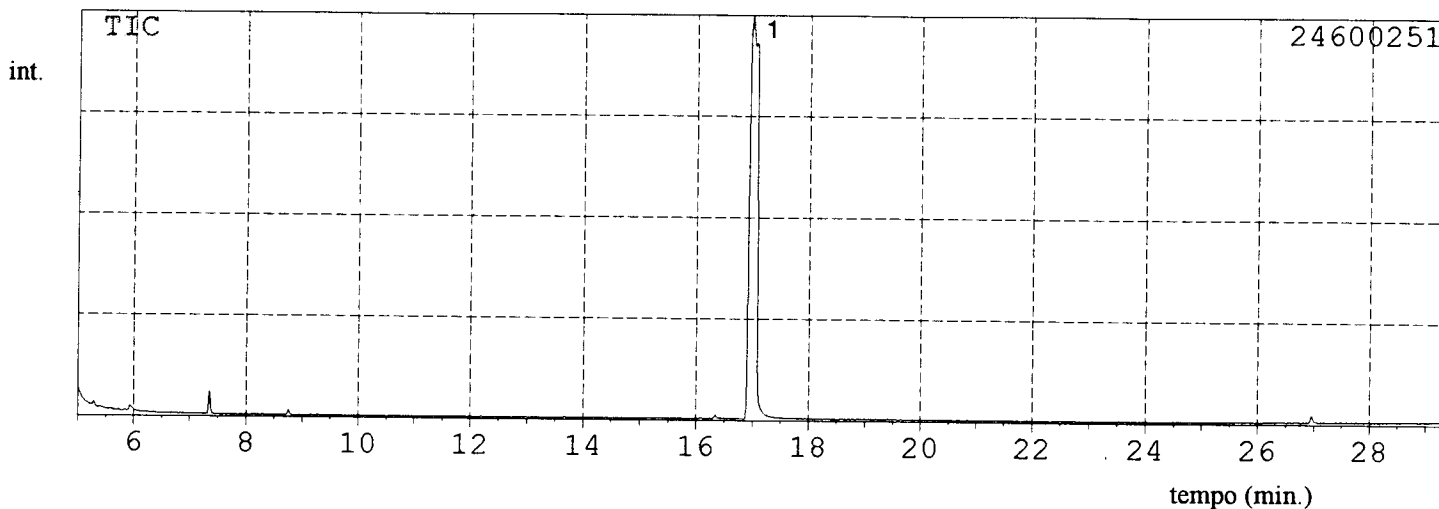


Figura 20- Cromatograma obtido por CGL do padrão eritritol silanizado (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 50°C por 5 minutos, e aumento até 130°C, 6°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30 mL/minuto.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : TRESIL.D01 96/01/04 13:27:05
Sample : treisilil
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

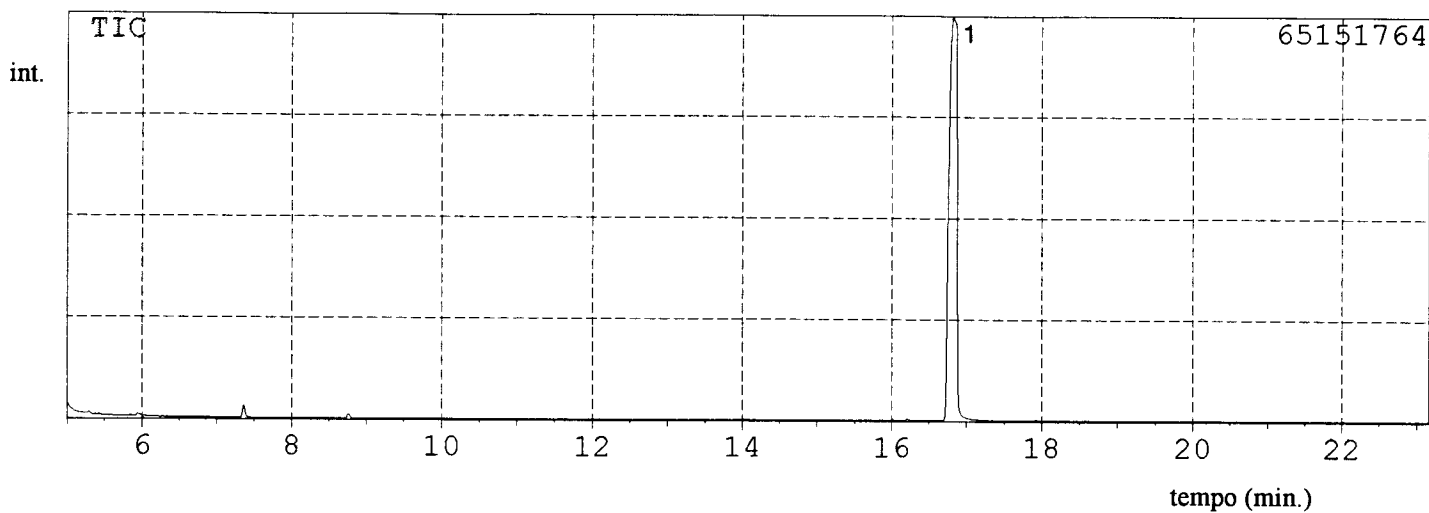
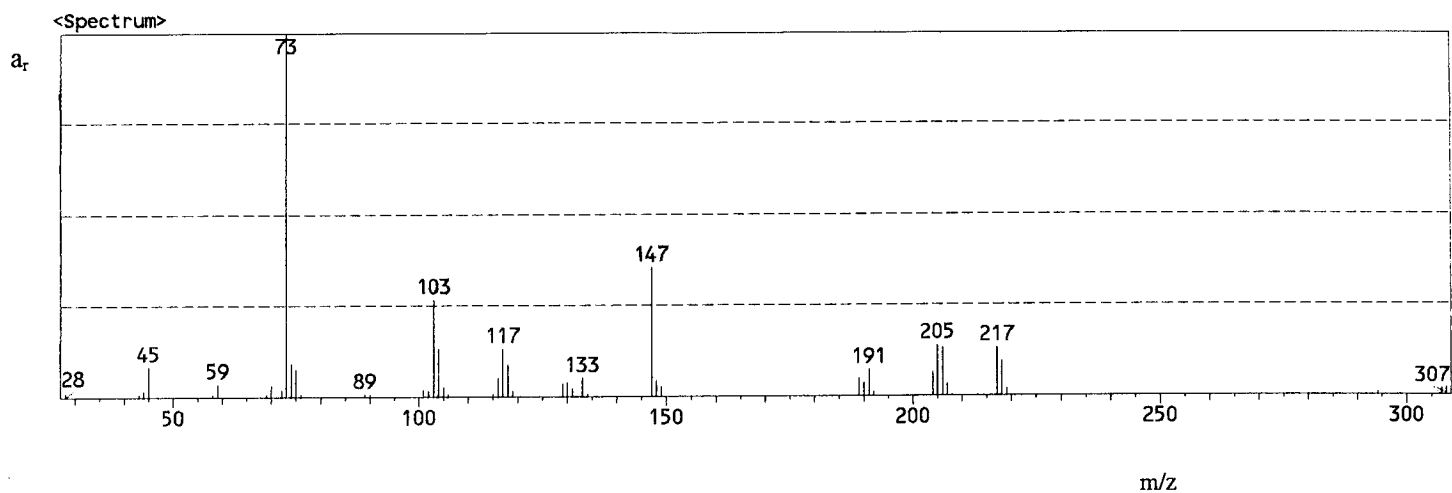


Figura 21- Cromatograma obtido por CGL do padrão treitol silanizado (Pico 1).
Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 50°C por
5 minutos, e aumento até 130°C, 6°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total
30 mL/minuto.



<Mass Table>

M/Z - Rel.Int (50 Peaks)

28-	1.2	102-	1.6	149-	2.8
43-	0.8	103-	26.8	189-	4.8
44-	1.6	104-	13.2	190-	3.6
45-	8.4	105-	2.8	191-	7.2
47-	0.4	106-	0.8	192-	1.2
58-	0.8	115-	0.8	204-	6.4
59-	3.6	116-	5.2	205-	14.0
69-	0.8	117-	13.2	206-	13.2
70-	3.2	118-	8.8	207-	3.2
72-	2.0	119-	1.6	208-	0.4
73-	100.0	129-	3.6	217-	13.2
74-	9.2	130-	4.0	218-	9.6
75-	7.6	131-	2.4	219-	2.0
76-	0.8	133-	5.2	294-	0.8
89-	0.8	134-	0.8	307-	1.6
90-	0.8	147-	35.6	308-	2.0
101-	2.0	148-	4.4		

<Structure>

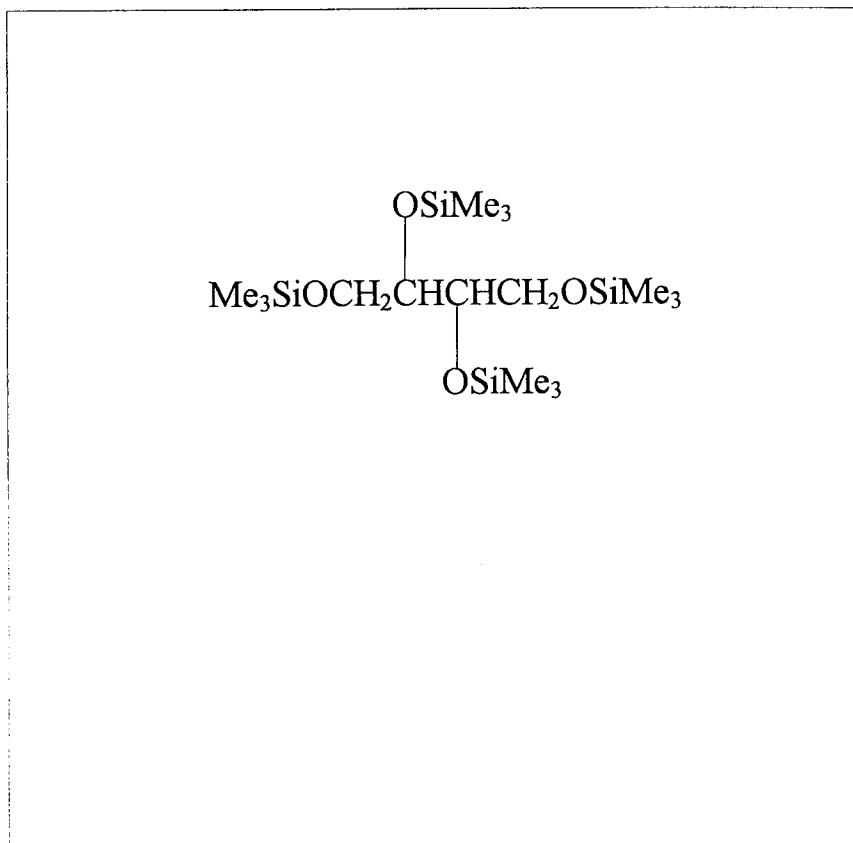
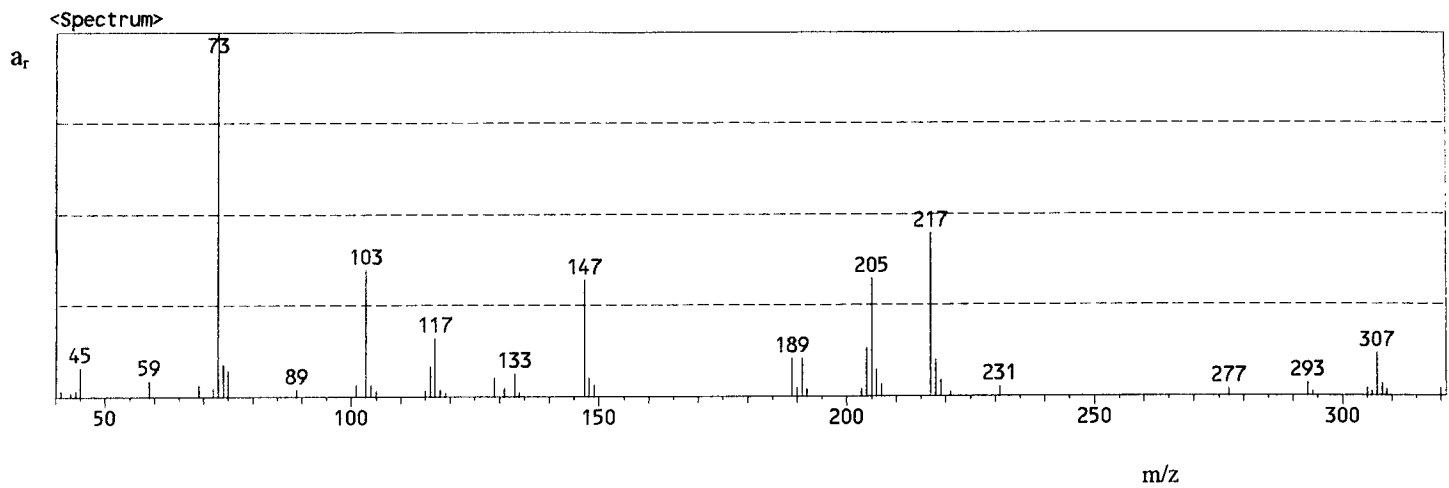


Figura 22- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do treitol obtido após oxidação, redução, hidrólise e silanização do polissacarídeo PS-32.



<Mass Table>

M/Z - Rel.Int (50 Peaks)

41- 1.6	117- 16.0	206- 7.2
43- 1.2	118- 2.0	207- 3.2
44- 1.6	119- 1.2	217- 44.8
45- 8.0	129- 5.2	218- 10.0
59- 4.4	131- 2.4	219- 4.4
69- 3.2	133- 6.4	221- 1.2
72- 2.4	134- 1.2	231- 2.8
73- 100.0	147- 32.0	277- 2.0
74- 8.8	148- 5.2	293- 3.6
75- 7.2	149- 3.2	294- 1.2
89- 2.0	189- 10.4	305- 2.0
101- 3.2	190- 2.4	306- 1.2
103- 34.8	191- 10.4	307- 11.6
104- 3.2	192- 2.0	308- 3.2
105- 1.6	203- 2.0	309- 1.6
115- 1.6	204- 13.2	320- 2.0
116- 8.4	205- 32.4	

<Structure>

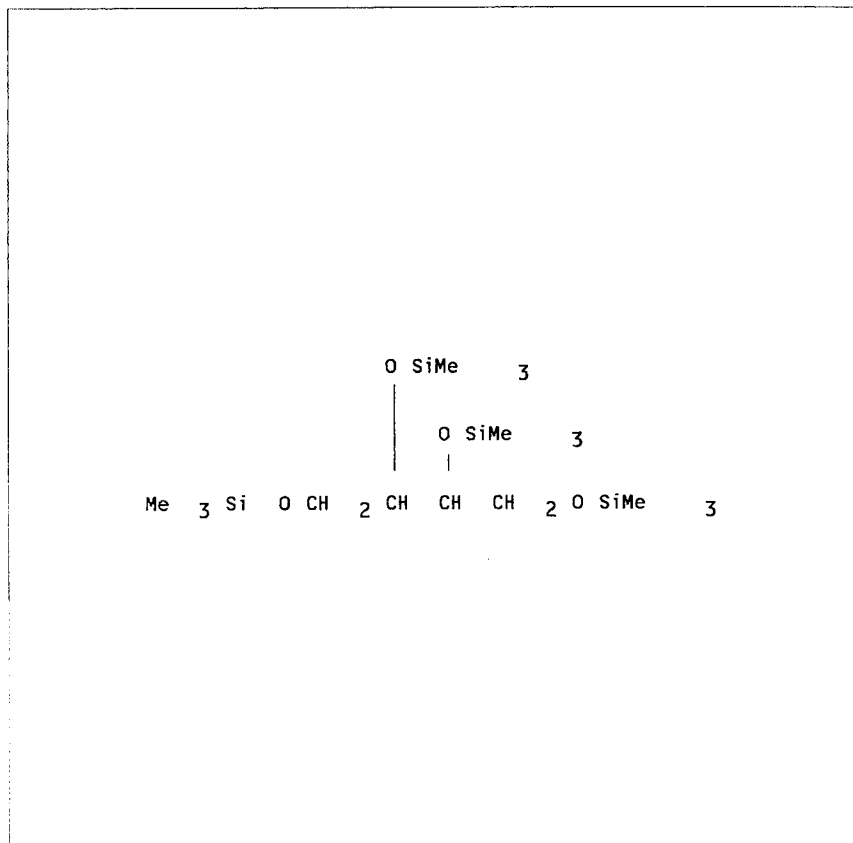
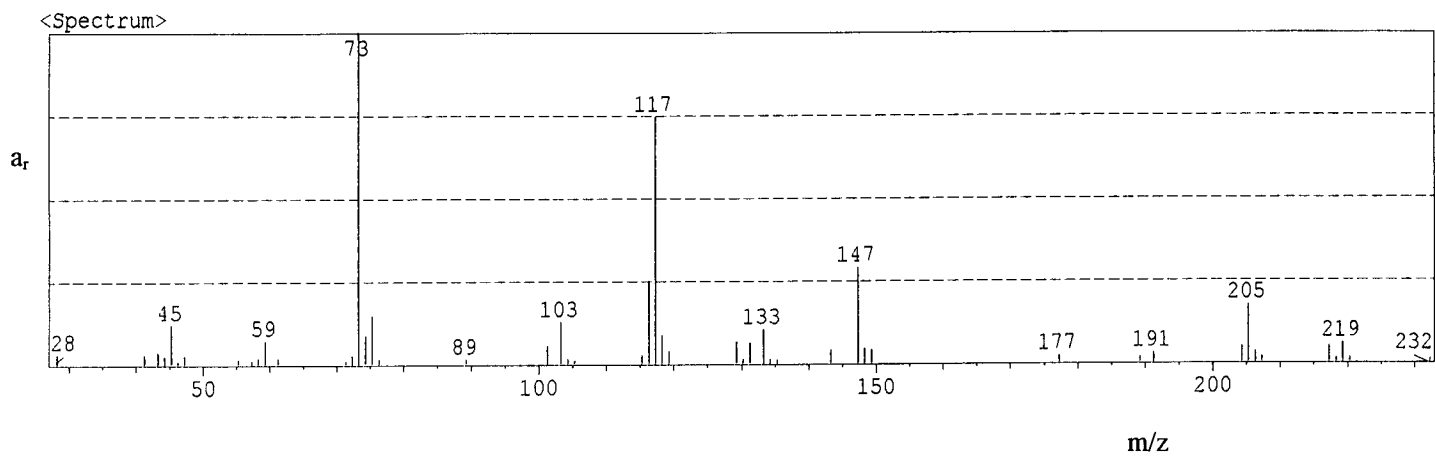


Figura 23- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do eritritol obtido após oxidação, redução, hidrólise e silanização do polissacarídeo PS-32.



<Mass Table>

M/Z - Rel.Int (50 Peaks)

28- 2.8	76- 1.2	143- 4.0
41- 2.8	89- 1.2	147- 28.8
43- 3.6	101- 5.2	148- 4.4
44- 2.4	103- 12.4	149- 4.0
45- 11.6	104- 1.2	177- 2.0
46- 0.8	105- 0.8	189- 1.6
47- 2.4	115- 2.4	191- 2.8
55- 1.2	116- 24.8	204- 4.8
57- 0.8	117- 74.4	205- 17.2
58- 1.6	118- 8.4	206- 3.2
59- 6.8	119- 3.6	207- 1.6
61- 1.6	129- 6.4	217- 4.8
71- 0.8	130- 1.2	218- 1.2
72- 2.4	131- 6.0	219- 5.6
73-100.0	133- 10.0	220- 1.2
74- 8.4	134- 1.2	232- 0.8
75- 14.4	135- 0.8	

<Structure>

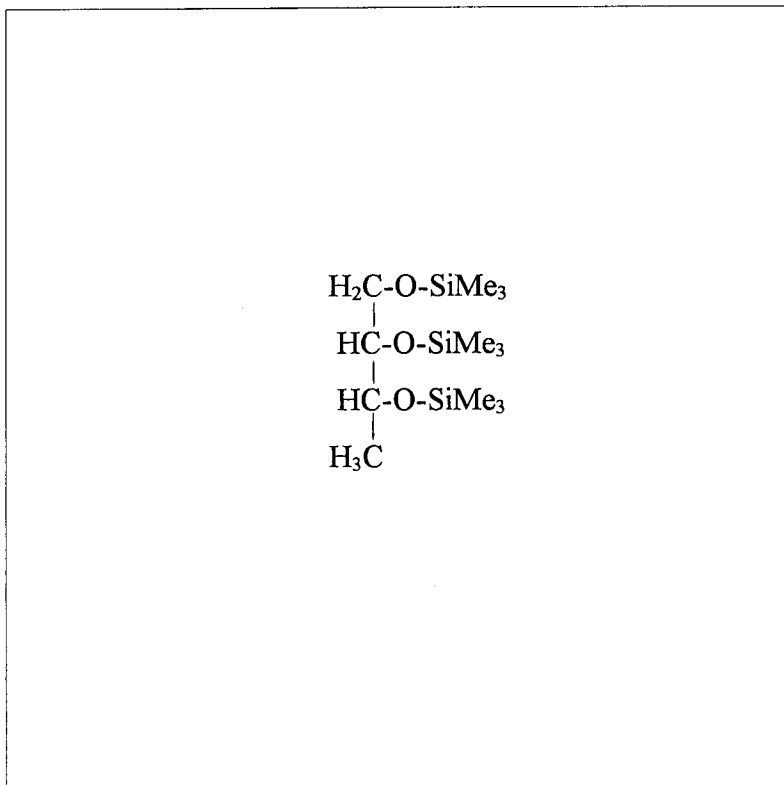


Figura 24- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,2,3-butanotriol obtido após oxidação, redução, hidrólise e silanização do polissacarídeo PS-32.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : GGFAA3.D01 96/01/08 11:16:59
Sample : ggfanac
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

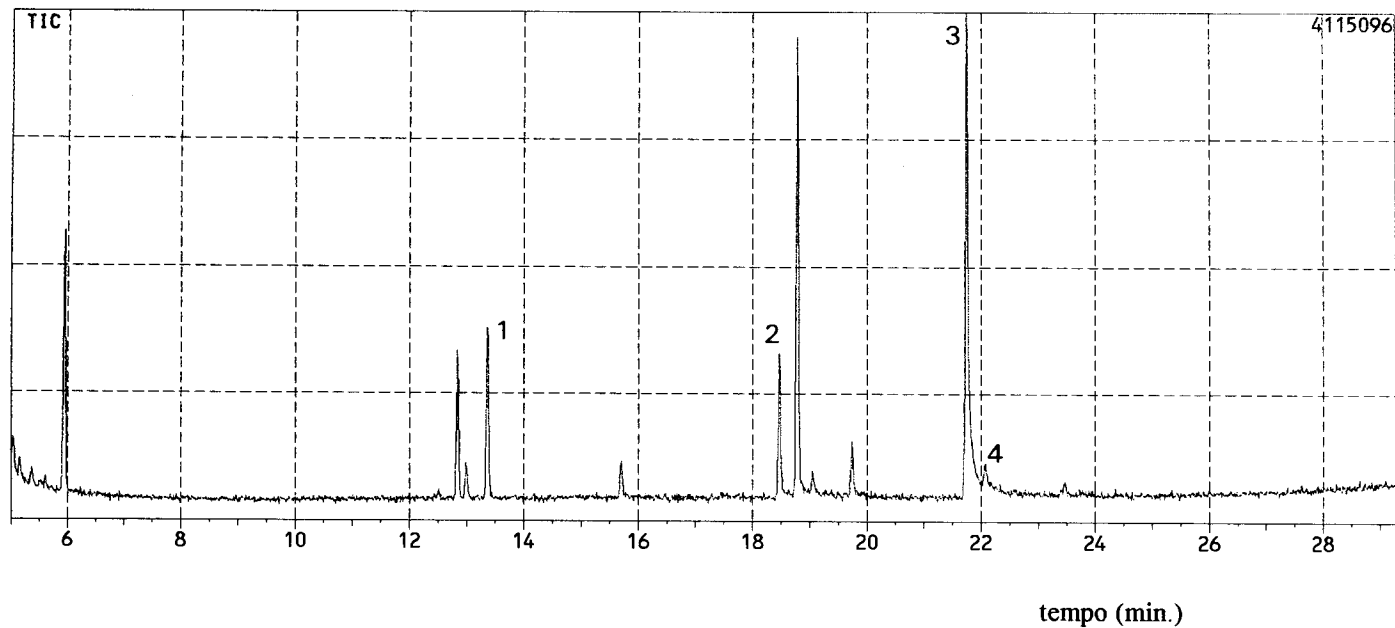


Figura 25- Cromatograma obtido por CGL dos alditóis acetilados parcialmente metilados obtidos a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação. Pico 1: 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metilfucitol; Pico 2: 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol; Pico 3: 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol; Pico 4: 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metilgalactitol. Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30mL/minuto.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : MAFUC.D01 96/01/03 12:36:44
Sample : mafuc
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

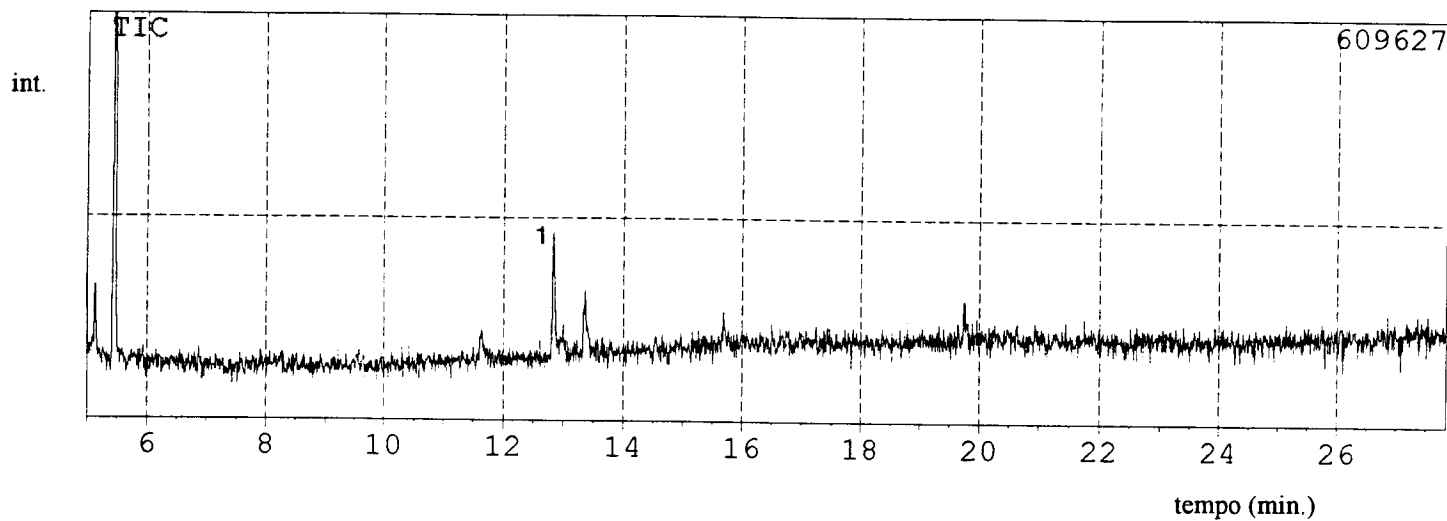


Figura 26- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 2,3,4-tri-O-metilfuose (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30mL/minuto.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : GLU1P.D01 95/11/06 13:13:10
Sample : glu
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

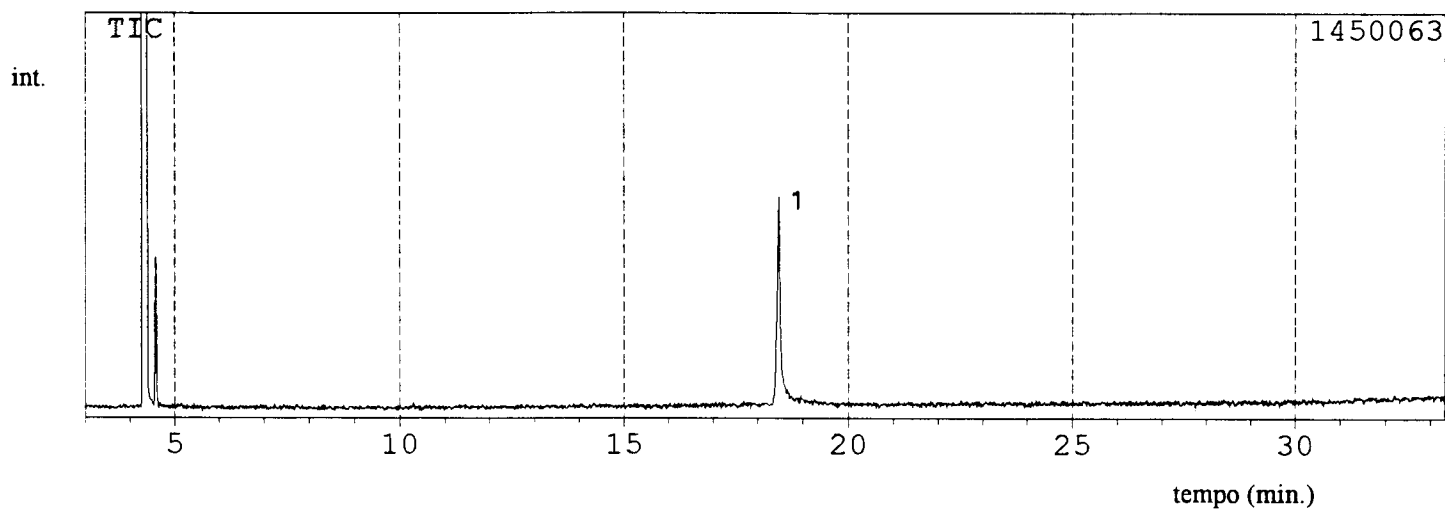


Figura 27- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 2,3,4,6-tetra-O-metilglucose (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30mL/minuto.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : DGAL2.D01 95/11/08 13:52:51
Sample : gal
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

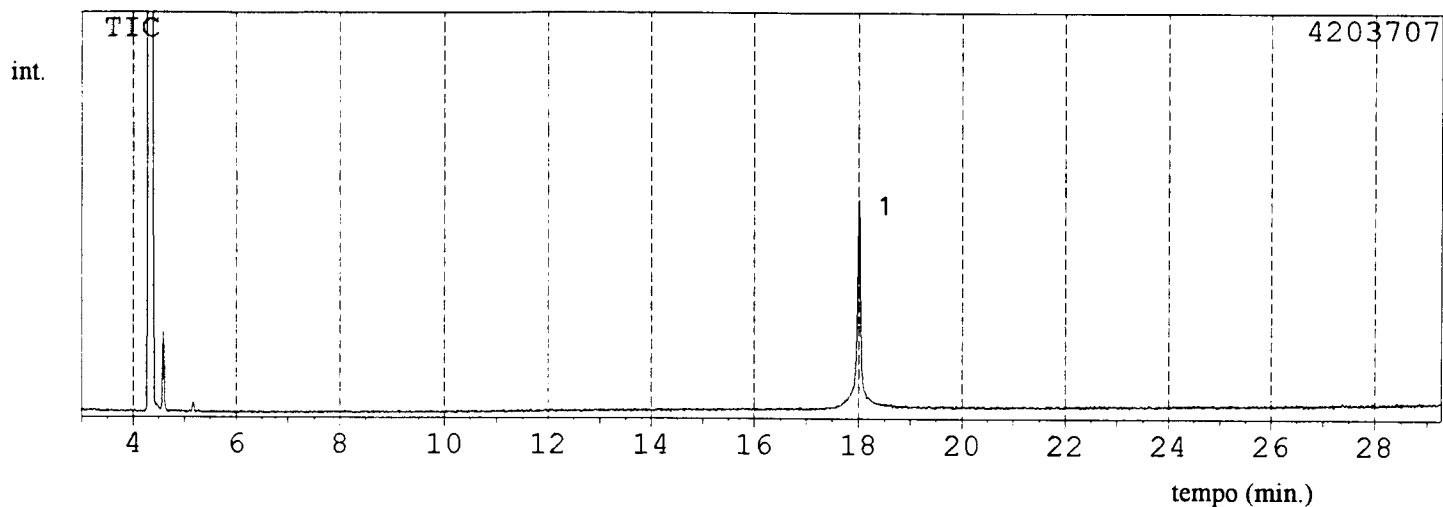


Figura 28- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactose (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30mL/minuto.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : MAFUCD.D01 96/01/03 16:20:35
Sample : magal
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

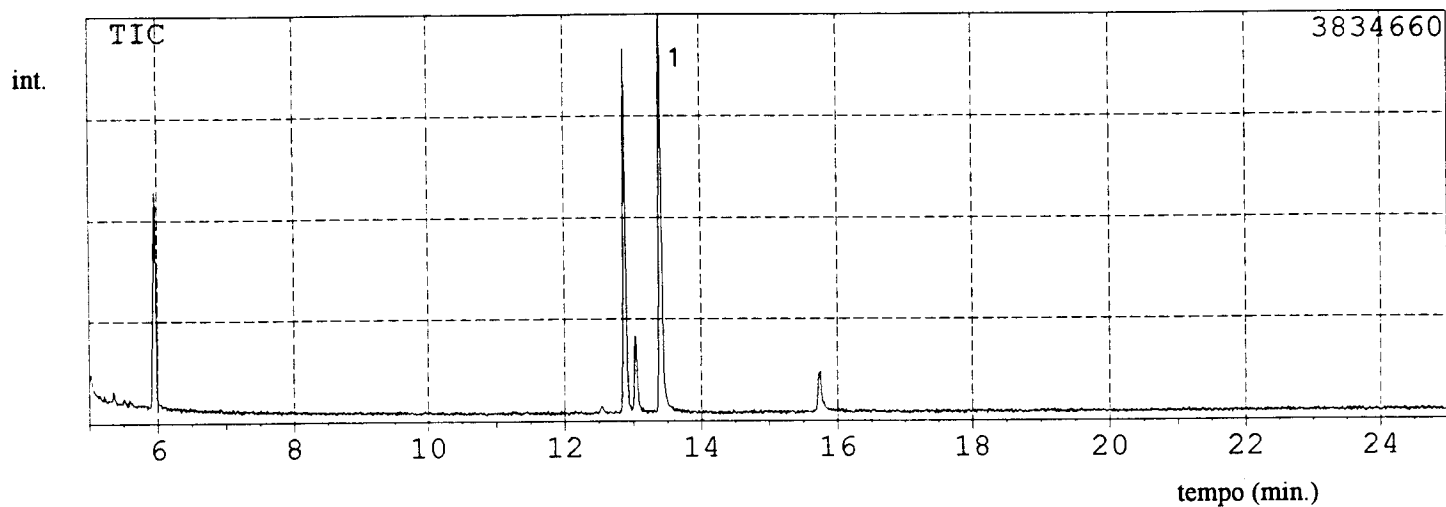


Figura 29- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 1,5-di-O-acetil-2,3,4,-tri-O-metilfucitol (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30 mL/minuto.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : MGALUD.D01 96/01/04 12:18:55
Sample : maglu
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

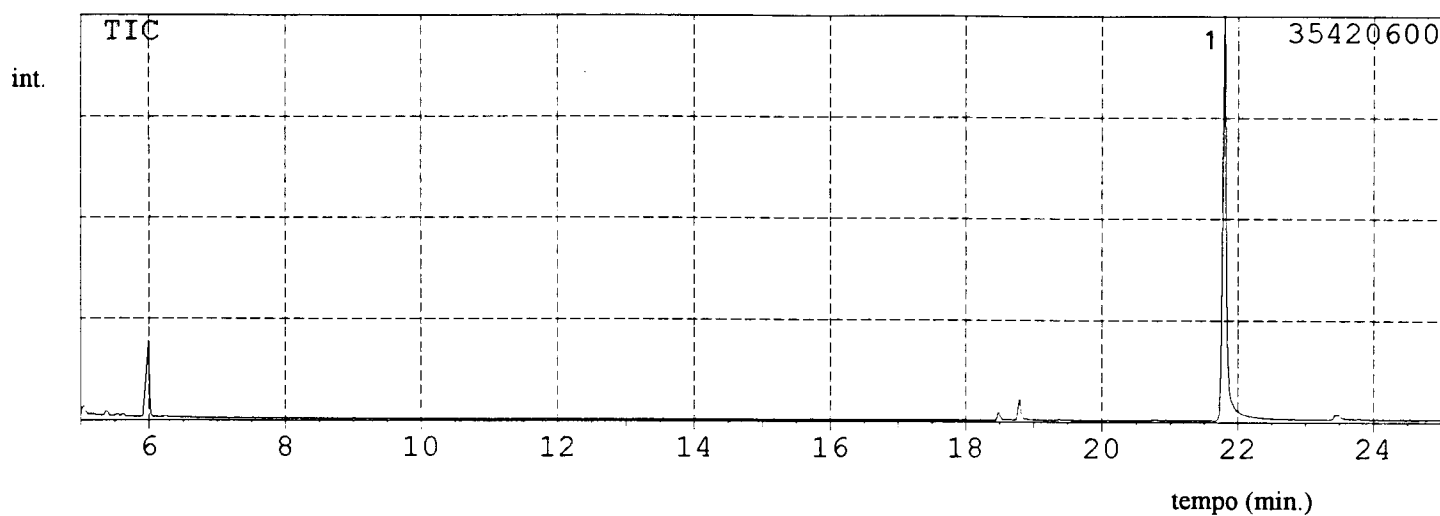


Figura 30- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30 mL/minuto.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : MGALD.D01 96/01/04 12:49:43
Sample : magal
Sample Amount : 1
Operator : dani
Method File Name : SUGAR1.MET

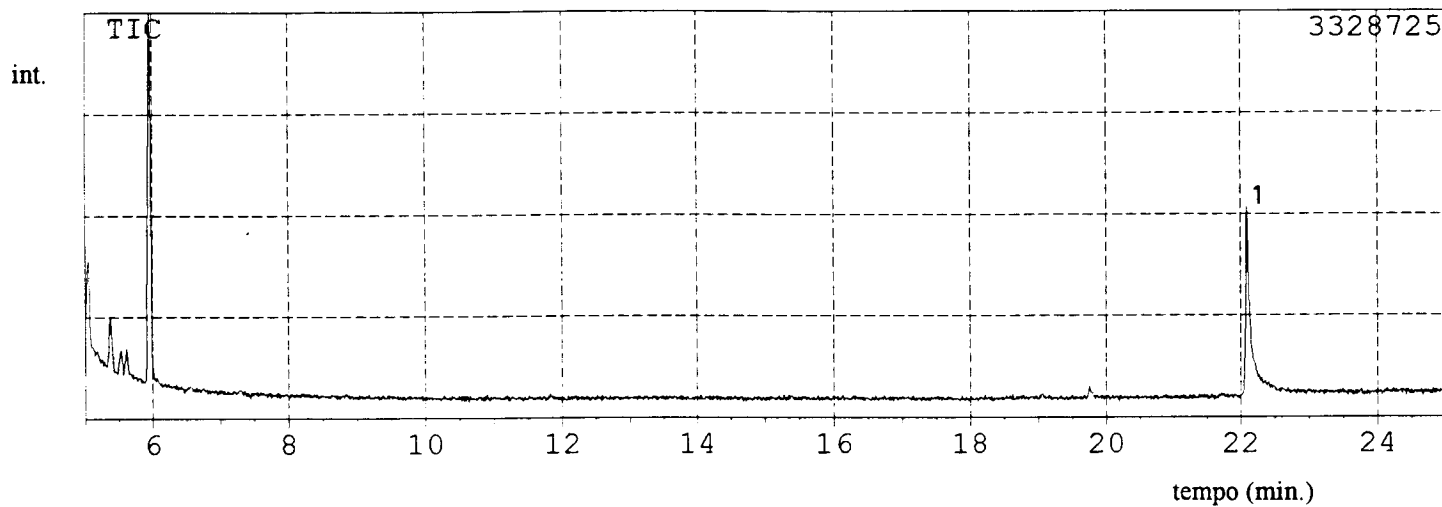
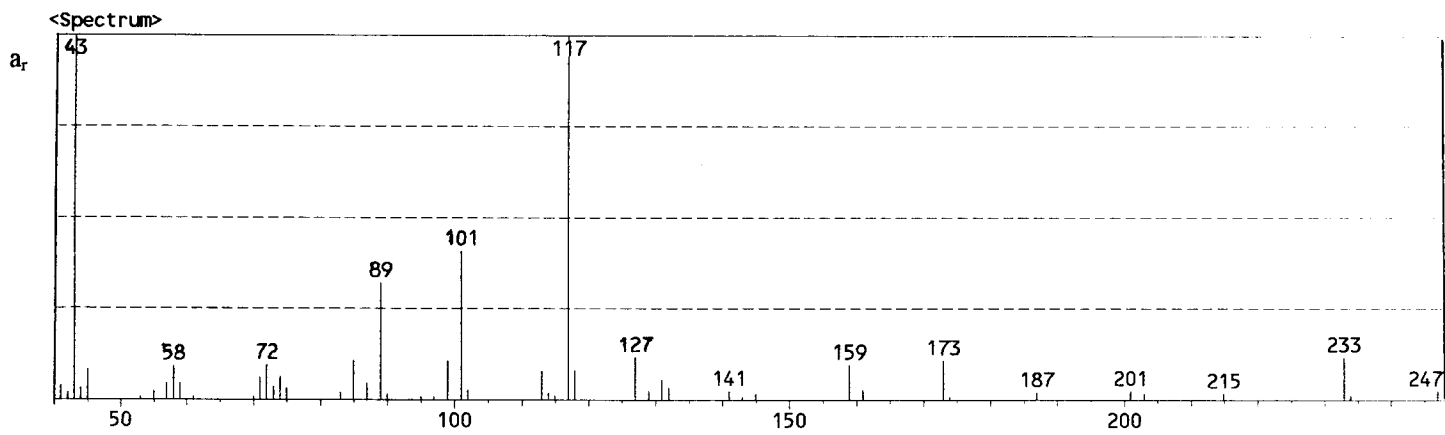


Figura 31- Cromatograma obtido por CGL referente ao padrão 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol (Pico 1). Condições: Coluna capilar de sílica fundida DB-5, 50 m x 0,22 mm, 130°C por 5 minutos, 130°C até 300°C, 7°C/minuto. Gás de arraste hélio, fluxo total 30 mL/minuto.



<Mass Table>

M/Z - Rel.Int (50 Peaks)

41- 4.0	83- 2.0	131- 5.6
42- 2.0	85- 10.8	132- 3.2
43-100.0	87- 4.4	141- 2.4
44- 3.2	89- 32.0	143- 0.8
45- 8.4	90- 1.6	145- 1.6
53- 0.8	95- 0.8	159- 9.6
55- 2.4	97- 0.8	161- 2.8
57- 4.4	99- 10.8	173- 10.8
58- 9.2	101- 40.8	174- 0.8
59- 4.4	102- 2.8	187- 2.0
61- 0.8	113- 8.0	201- 2.4
70- 0.8	114- 2.0	203- 1.6
71- 6.0	115- 1.2	215- 1.6
72- 9.6	117-100.0	233- 11.6
73- 3.6	118- 8.0	234- 1.2
74- 6.4	127- 11.6	247- 2.4
75- 3.2	129- 2.4	

<Structure>

m/z

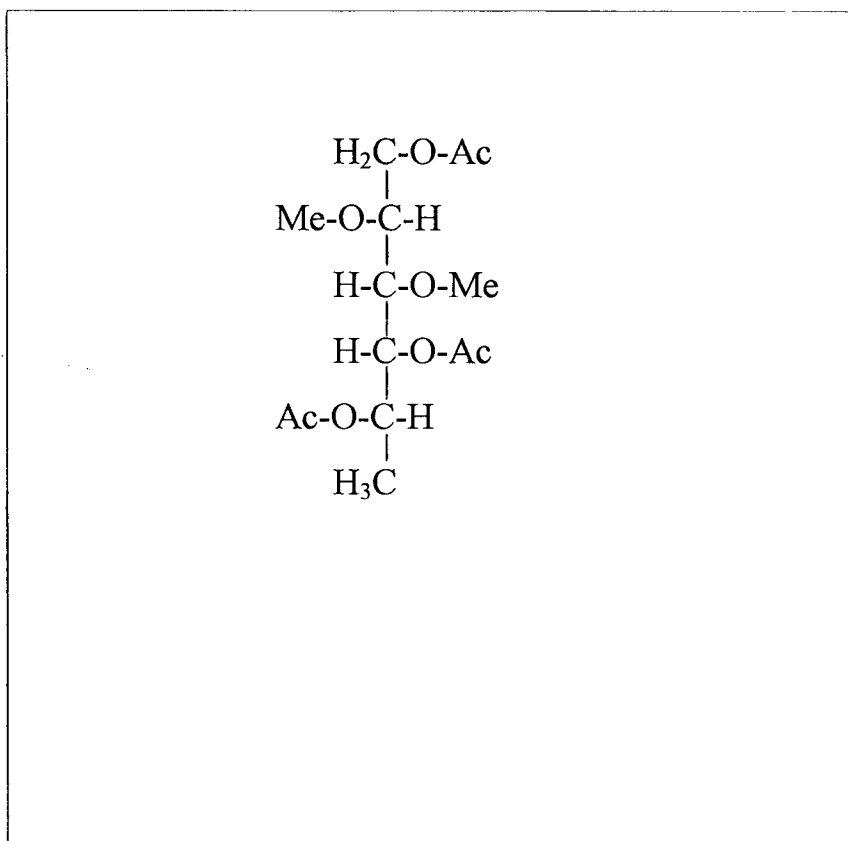
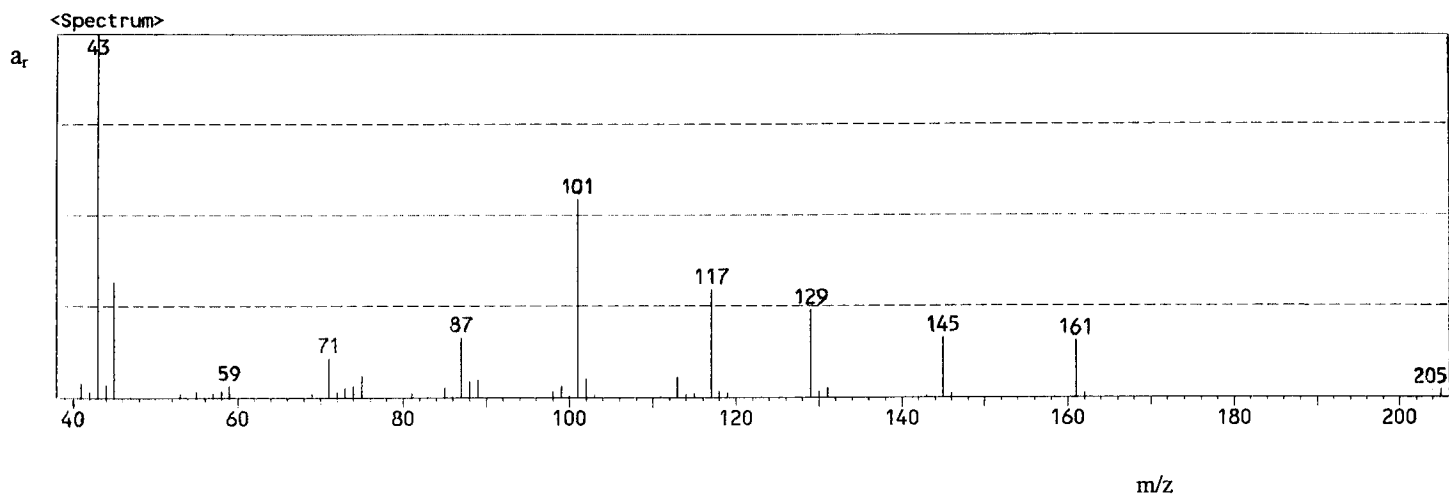


Figura 32- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metilfucitol obtido a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação.



<Mass Table>

M/Z - Rel.Int (50 Peaks)

39- 0.2	72- 1.6	111- 0.2
41- 4.0	73- 2.8	113- 5.6
42- 1.6	74- 3.2	114- 0.8
43- 100.0	75- 6.0	115- 1.2
44- 3.6	81- 1.2	117- 29.6
45- 31.6	83- 0.2	118- 1.6
46- 0.2	85- 2.8	119- 1.2
47- 0.2	86- 0.2	129- 24.0
53- 1.2	87- 16.4	130- 1.6
55- 1.6	88- 4.4	131- 2.8
56- 0.2	89- 4.8	143- 0.4
57- 1.2	98- 1.6	145- 16.4
58- 2.0	99- 3.2	146- 1.2
59- 3.2	100- 0.4	161- 15.6
69- 1.2	101- 54.4	162- 1.2
70- 0.2	102- 5.2	205- 2.0
71- 10.8	103- 0.8	

<Structure>

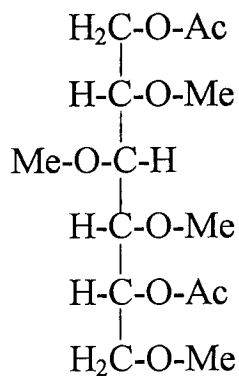
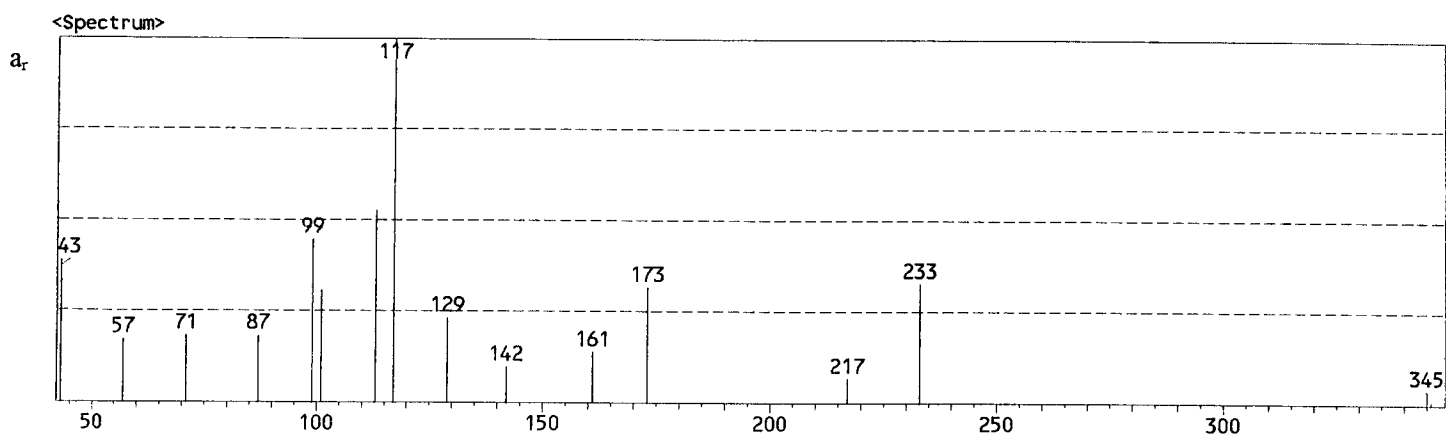


Figura 33- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol obtido a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação.



<Mass Table>

M/Z - Rel.Int (18 Peaks)

43- 38.8	113- 52.8	217- 6.8
57- 17.2	117-100.0	233- 32.8
71- 18.4	129- 23.2	345- 4.0
87- 18.4	142- 10.0	346- 0.8
99- 44.8	161- 14.0	347- 0.2
101- 30.8	173- 31.6	348- 0.2

<Structure>

m/z

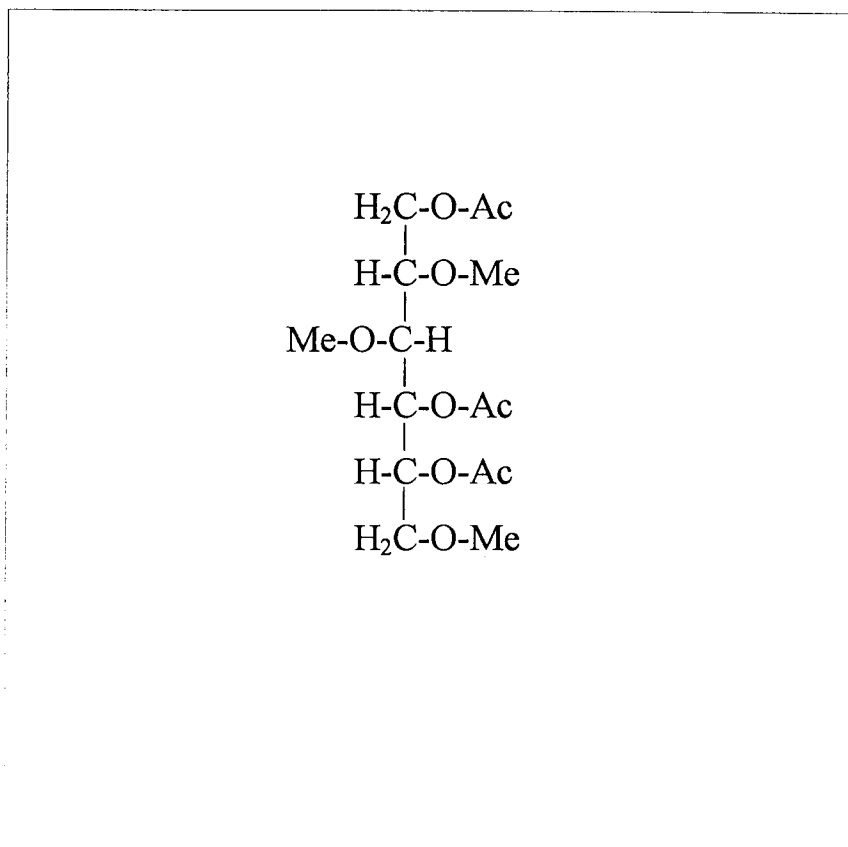
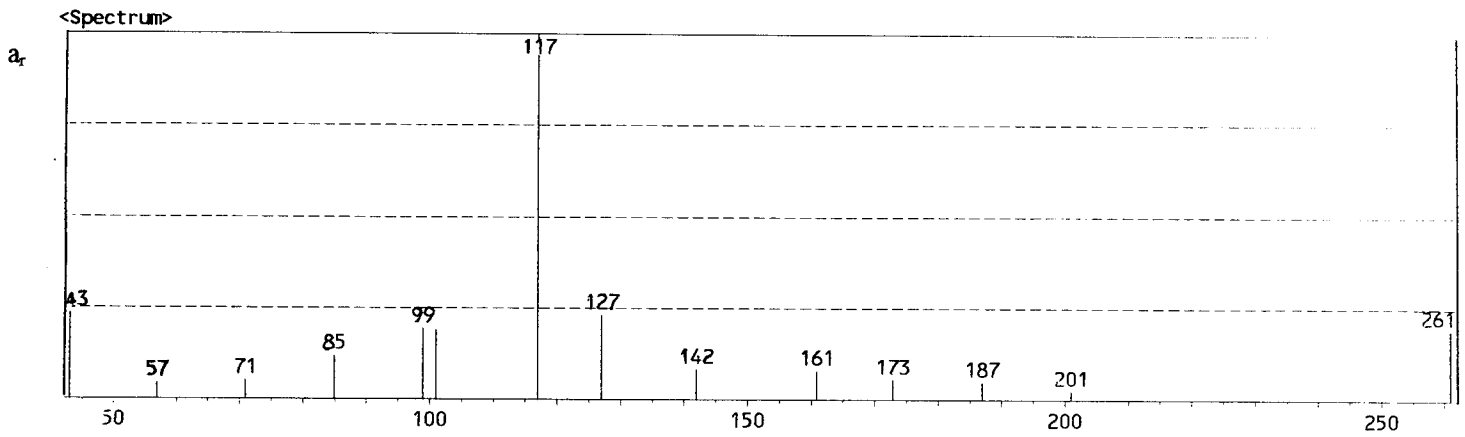


Figura 34- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol obtido a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação.



<Mass Table>

M/Z - Rel.Int (14 Peaks)

43- 23.6	101- 19.2	173- 5.6
57- 4.4	117-100.0	187- 4.8
71- 5.2	127- 23.2	201- 2.4
85- 12.0	142- 8.4	261- 19.2
99- 19.6	161- 8.0	

<Structure>

m/z

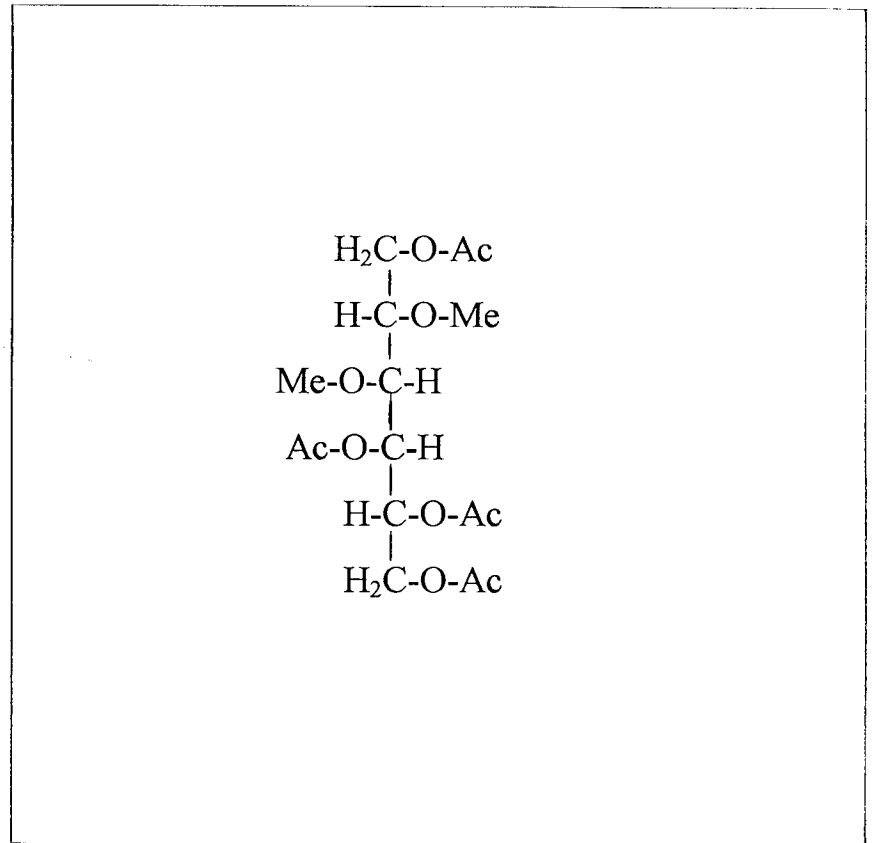


Figura 35- Espectro de massa de impacto eletrônico (70 eV) do 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metilgalactitol obtido a partir do polissacarídeo PS-32 após metilação, hidrólise, redução e acetilação.

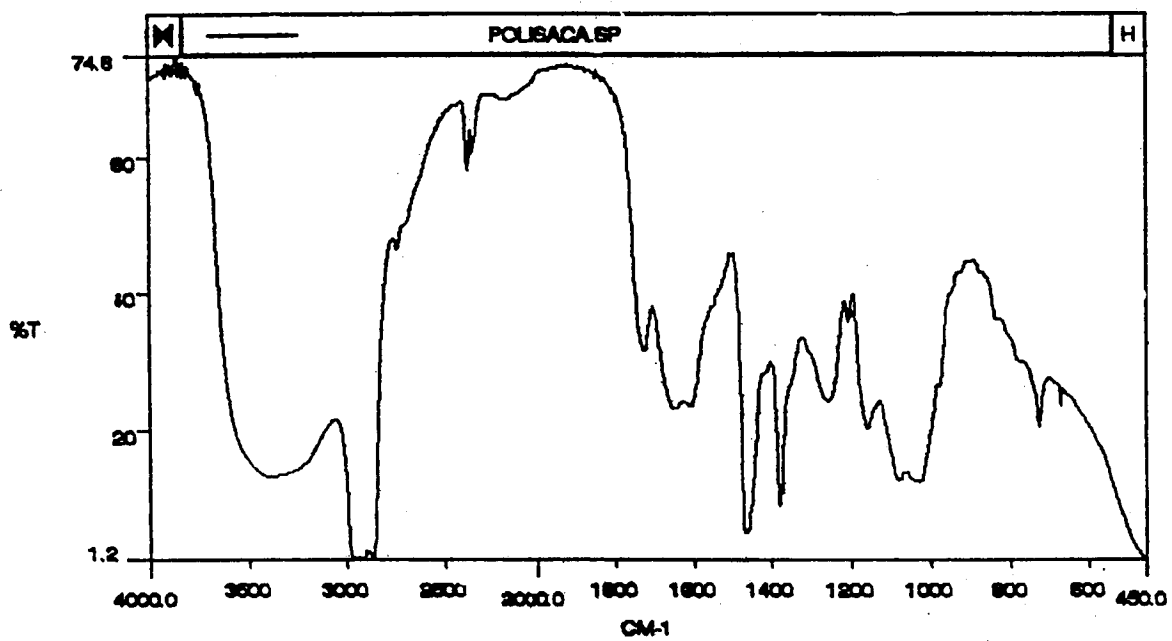


Figura 36- Espectro na região do IV do polissacarídeo PS-32.

File created:
Saturday, June 10, 1995
20:54

Field 7.052
 Freq 300.640365
 SW +/- 2000.0
 Dwell Time 2.5000e-04
 FIDRES 71.0733
 SFO 400.0
 Decoupler 300.640365
 B 0.0000000
 128
 No. Scans 8198
 Ac. Points 5.00e-01
 Last Delay 1.00
 Line Width 90
 Nucleus 13CULLS
 Sequence GPCMF-H
 Filename 2.05e+00
 Acq. Time 12
 Scale

Polysaccharide CV-70
 (14 h hydrolysis), derivatized
 (with Me₃SiCl)
 Solvent: D₂O
¹H NMR spectrum (300 MHz)

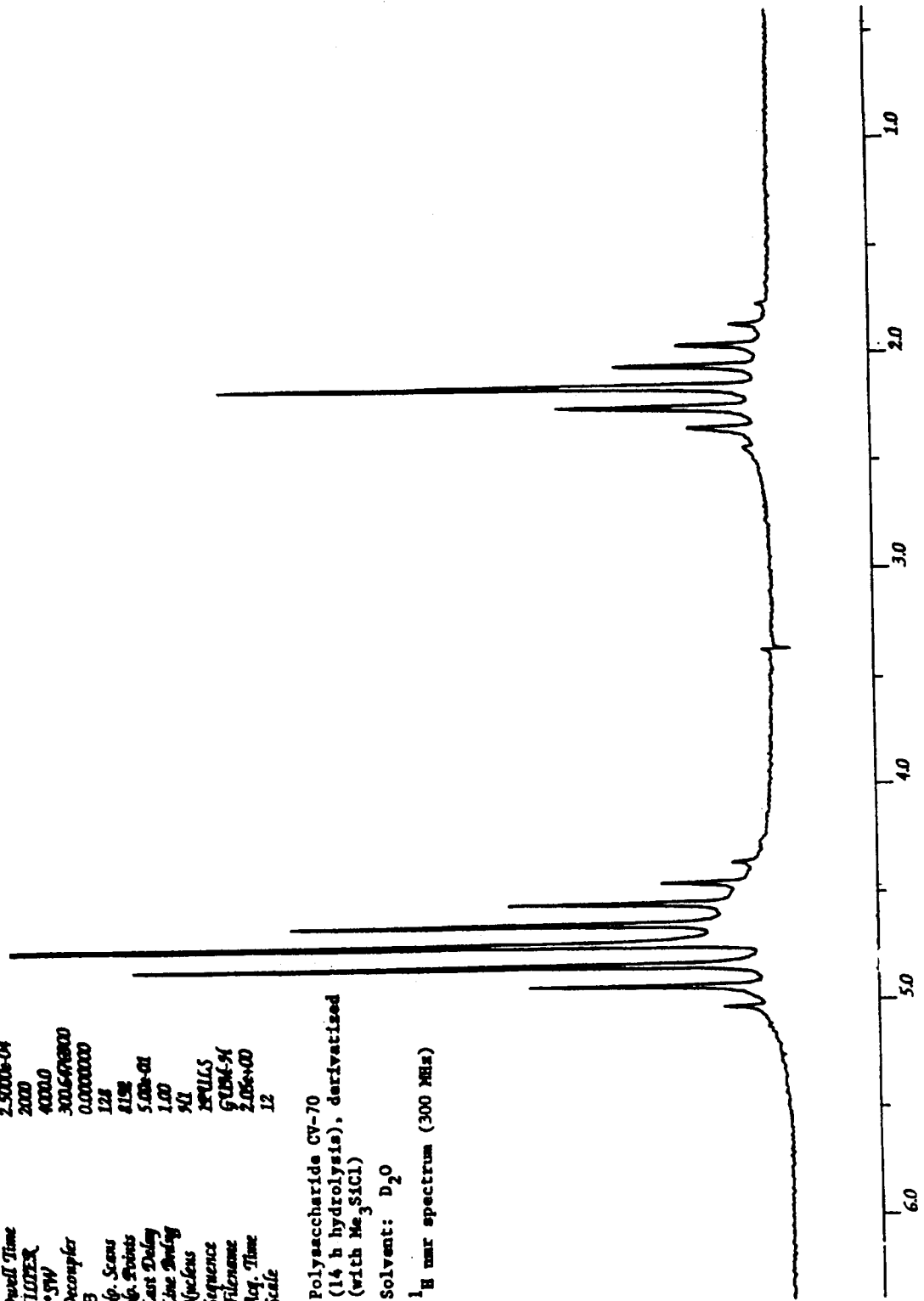


Figura 37- Espectro de RMN de ¹H do polissacarídeo PS-32.

File created:
Monday, June 27, 1994
11:17 AM

Field 7.062
Obs Freq 76.5071387
SW +/- 10000.0
Dwell Time 5.0000e-05
FILTER 10000
P1 SW 20000.0
Decoupler 300.6489507
F3 0.0000000
No. Scans 250000
No. Points 16384
Last Delay 5.00e-01
Line Brdg 2.00
Nucleus C13
Sequence 1PULS B 13C 1st
Filename 8.19e-01
Acq. Time 20
Scale 1.13
Amplitude

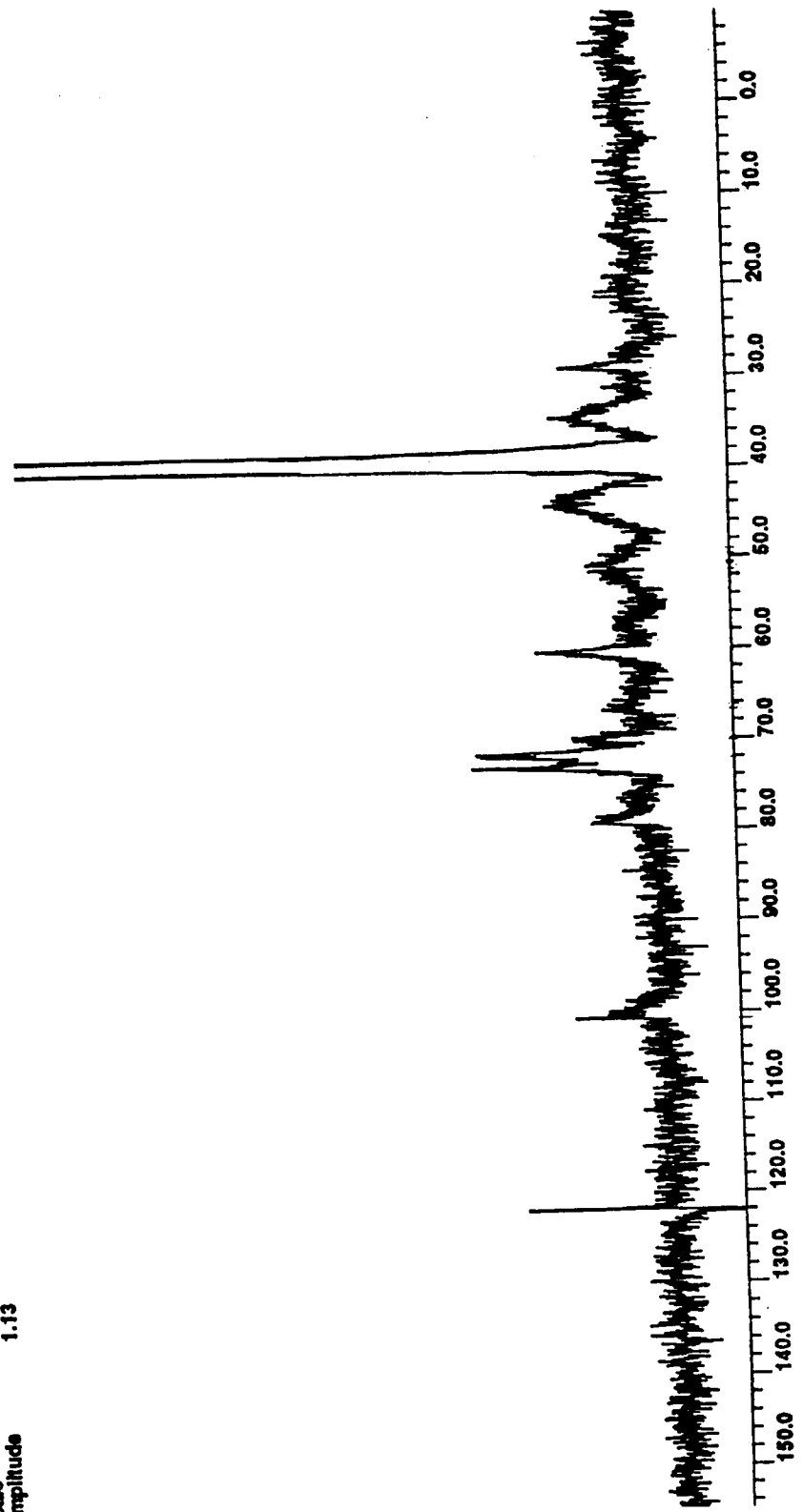


Figura 38- Espectro de RMN de ¹³C do polissacarídeo PS-32.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D. J.; ENGLISH, P. D. e KARR, A.. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharide by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research* **5**, 340-345, 1967.
- ANDERSON, D.M.V.; GREENWOOD, C.T. e HIRST, E.L.. Physicochemical studies on starches. Part II. The oxidation of starches by potassium metaperiodate. *J. Chem. Soc.* 225-231, 1955.
- ASPINALL, G.O. & JIANG, K.S.. Rapeseed hull pectin. *Carbohydrate Research* **38**, 247-255, 1974.
- ASPINALL, G.O.; MCDONALD, A.G.; RAYU, T.S.; PANG, H.; KURJANCZIK, L.A.; PENNER, J.L. e MORAN, A.P.. Chemical structure of the core region of *Campylobacter jejuni* serotype O:2 lipopolysaccharide. *Int. J. Bioche.* **213**, 1029-1037, 1993.
- BAIRD, J.K.; HOLROYDE, M.J. e ELLWOOD, D.C.. Analysis of the products of Smith degradation of polysaccharides by g.l.c. of the acetylated, derived aldonitriles and alditols. *Carbohydrate Research* **27**, 464, 1973.
- BANCAL, P. e GAUDILLÈRE, J.-P.. Oligofructan separation and quantification by high performance liquid chromatography. Application to *Asparagus officinalis* and *Triticum aestivum*. *Plant Physiol. Biochem.* **27** (5), 745-750, 1989.
- BARKER, S.A.; BOURNE, E.J.; STEPHENS, R. e WHIFFEN, D.H.. Infra-red spectra of Carbohydrates. Part II. Anomeric configuration of some hexo- and pento-pyranoses. *J. Chem. Soc. (London)*, 3468-3473, 1954.

- BISHOP & COOPER.. Separation of carbohydrates derivatives by gas-liquid partition chromatography. *Can. J. Chem.* **38**, 388, 1960.
- BJÖRNDAL,H.; LINDBERG, B. e SVENSSON, S.. Mass Spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carohydrate Research* **5**, 433-440, 1967.
- BJÖRNDAL,H.; HELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B. e SVENSSON, S.. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **9**, 610-619, 1970.
- BOCIEK, S.M.; IZZARD, M.J.; MORRISON, A. e WELTI, D.. The C13-n.m.r. spectra of (1-6)- α -D-galactosyl-(1-4)- β -D-mannans. *Carohydrate Research* **93**, 279-283, 1981.
- BRADBURY, A.G.W. & HALLIDAY, D.J.. Chemical Structures of green coffee bean polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 389-392, 1990.
- CARPITA, N.C. & SHEA, E.A.. Em *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. Editores Biermann, C.J. e McGinnis, G.D.. CRC Press, Inc., pp. 157, 1988.
- CHAPLIN, M.F. & KENNEDY, J.F.. Em *Carbohydrate Analysis - a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1986.
- CIUCANU, I. & KEREK, F.. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* **131**, 209-217, 1984.
- CLARKE, M.A.. Em "Sugars and Sugars Products", Sugar Processing Research Institute, Inc.; A.O.A.C. Official Methods of Analysis, cap. 44, 2-3, vol 2, parte II, 16^a Edição, 1995.

- DE RUITER, G.A.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. e ROMBOUTS, F.M.. Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry* **207**, 176-185, 1992.
- DUTTON, G.G.S.; GIBNEY, K.B.; JENSEN, G.D. e REIS, P.E.. The simultaneous estimation of polyhydric alcohols and sugars by gas-liquid chromatography: applications to periodate oxidized polysaccharides. *J.Chromatogr.* **36**, 152, 1968.
- ENGLMAIER, P.; HONDA, S. e BIERMANN, J.. Em *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. Editores Biermann, C.J. e McGinnis, G.D.. CRC Press, Inc., pp. 257, 1988.
- FUKAGAWA, K.; YAMAGUCHI, H.; UOTANI, O.; TSUIMOTO, T. e YONEZAWA, D.. Structural studies on fucogalactan produced by *Rhodotorula glutinis* K-24: Characterization of acetyl ester and application of sequential periodate oxidation. *Agr. Biol. Chem.* **39**, (9), 1703-1710, 1975.
- GIDLEY, M.J.; MCARTHUR, A.J. e UNDERWOOD, D.R.. ¹³C NMR characterization of molecular structures in powders hydrates and gels of galactomannans and glucomannans. *Food Hydrocolloids* **3**(1/2), 129-140, 1991.
- GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M.. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Can. J. Chem.* **53**, 1212-1222, 1975.
- GRASDALEN, H.; BAKOY, O.E. e LARSEN, B.. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by H-N.M.R. spectroscopy. *Carbohydrate Research* **184**, 183-191, 1988.

- GRUE, M.R.; PAROLIS, H. e PAROLIS, L.A.S.. Structural elucidation of the capsular polysaccharide of *Escherichia coli* serotype K101 by high resolution NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **246**, 283-290, 1993.
- HAKOMORI, S.I.. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem. (Tokio)*, **55**, 205-208, 1964.
- HONDA, S.. High-performance liquid chromatography of mono- and oligosaccharides. *Analytical Biochemistry*, **140**, 1-47, 1984.
- JANSSON, P.-E.; LINDBERG, B.; WIDMALM, G. and SANDFORD, P.A.. Structural studies of an extracellular polysaccharide (S-130) elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31555. *Carbohydrate Research* **139**, 217-223, 1985.
- JANSSON, P.-E.; LINDBERG, B. and SANDFORD, A.. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research* **124**, 135-139, 1983.
- KOCHAROVA, N.A.; THOMAS-OATES, J. E.; KNIREL, Y.A.; SHASHIKOV, A.S.; DRABOWISKI, U.; KACHETKOV, N.K.; STANILAVSKY, E.S. e KHOLODKOVA, E.V.. The structure of the O-specific polysaccharide *Citrobacter* O16 containig glycerol phosphate. *Eur. J. Biochem.* **219**, 653-661, 1994.
- KRULL, L.H. & COTE, G.L.. Determination of gulose and/or guluronic acid by ion chromatography and pulse amperometric detection. *Carbohydrate Polymers* **17**, 205-207, 1992.
- LINDBERG, B. & LÖNNGREN, J.. Methylation analysis of complete carbohydrates: general procedure and application for sequence analysis. *Methods in Enzymol.* **50c**, 1978.

- LITWACK, G.. Em *Experimental Biochemistry*. Editores: John Wiley & Sons, New York, 1960.
- MCCOMB, E.A. & MCCREADY, R.M.. Colorimetric determination of pectic substances. *Anal. Chem.* **24**, 1630-1632, 1952.
- MCCOMB, E.A. & MCCREAD, R.M.. determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Anal. Chem.* **29**, 819-821, 1957.
- MCINNES, J.. Separation of carbohydrates derivatives by gas-liquid partition chromatography *J.Chromat* **1**, 556, 1958.
- MISCHINIK, P. & DE RUITER, G.A.. Application of reductive cleavage in the structural investigation of the antigenic polysaccharides of *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium digitatum* with respect to the determination of the ring size of the galactose moieties. *Carbohydrate Polymers* **23**, 5-12, 1994.
- O'NEIL, M.A.; SELVENDRAN, R.R. e MORRIS, V.J.. Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research* **124**, 123-133, 1983.
- PAZUR, J.H. e FORSBERG, L.S.. Hemiacetal bond-formation during periodate oxidation of a heteroglycan of D-glucose and D-galactose. *Carbohydrate Research* **58**, 223-226, 1977.
- PAZUR, J.H.. Em *Carbohydrate analysis - a practical approach*. Editores: Chaplin, M.F. & Kennedy, J.F., IRL Press, Oxford, 1986.
- PETERS, H.-U.; SUH, I.-S.; SCHUMPE, A. e DECKWER, W.-D.. The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. *Biotechnology Letters* **15** (6), 565-566, 1993.
- PHILLIPS, L.R. e FRASER, B.A.. Methylation of carbohydrates with dimethyl potassium in dimethyl sulfoxide. *Carbohydrate Research* **90**, 149-152, 1981.

- PLAGA, A.; STÜMPFEL, J. e FIEDLER, H.-P.. Determination of carbohydrates in fermentation processes by high-performance liquid chromatography. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 45-49, 1989.
- QUEMENER, B. & THIBAUT, J.F.. Studies on the simultaneous determination of acidic and neutral sugars of plant cell wall materials by HPLC of their methyl glycosides after combined methanolysis and enzymic prehydrolysis. *Carbohydrate Research* **206**, 277, 1990.
- READ, R. R. & CONSTERTON, J. W.. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharide from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 1080-1090, 1987.
- RITCHIE, R.G.S.; CYR, N.; KORSCH, B.; KOCH, H.J. e PERLIN, A.S.. Carbon-13 chemical shifts of furanosides and cyclopentanols. Configurational and conformational influences. *Can. J. Chem.* **53**, 1424-1433, 1975.
- RYDEN, P.; ALLQUHOUN, I.J. e SELVEDRAN, R.R.. Investigation of structural features of the pectic polysaccharides of onion by ¹³C-N.M.R. spectroscopy. *Carbohydrate Research* **185**, 233-237, 1989.
- SCAMPARINI, A.R.P.. Estrutura do polissacarídeo do caraguatá (*Bromelia faustuosa*, LINDL). Tese de doutorado. UNICAMP, 1980.
- SEKHARAM, K.M.; VENKATARAMAN, L.V. e SALIMATH, P.V.. Structural studies of a glucan isolated from blue-green alga *Spirulina platensis*. *Chemistry* **31**, 85-91, 1989.
- SHASHKOV, A.S.; VINOGRADOV, E.V.; KNIREL, Y.A.; NIFANT'EV, N.E.; KOCHETKOV, N.K.; DABROWISK, J.; KHOLODKOVA, E.V. e STANISLAVISKY, E.S.. Structure of the O-specific polysaccharide of *Salmonella arizonae* O45. *Carbohydrate Research* **241**, 177-188, 1993.
- STEVENSON, T.T. & FURNEAUX, R.H.. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research* **210**, 277-298, 1991.

- STORTZ, C.A. & CERESO, A.S.. The systems of carrageennans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridaea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions. *Carbohydrate Research* **242**, 217-227, 1993.
- VENDRUSCOLO, C.T.. Produção de biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. isolada de solo cultivado com cana de açúcar no estado de São Paulo, Brasil; Tese de Doutorado, 1995.
- VOELTER, W. e BREITMAIER, E.. The influence of methylation on ^{13}C chemical shifts of galactose derivatives. *Tetrahedron* **29**, 3845-3848, 1973.
- VORAGEN, A.G.J., SCHOLS, H.A.; SCARLE-VAN LEEUWEN, M.F.; BELDMAN, G. e ROMBOOTS, F.M.. Analysis of oligomeric and monomeric saccharides from enzymatically degraded polysaccharides by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 113-120, 1986.
- WOOD, P.J.; WEISZ, J. e BLAKWELL, B.A.. Molecular characterization of cereal B-D-glucans. Structural analysis of oat β -D-glucan and rapid structural evaluation of β -D-glucan from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chem.* **68**(1), 31-39, 1991.
- YAMAMOTO, K.; YOSHIKAWA, K. e OKADA, S.. Structure of dextran synthesized by dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894. *Biosci. Biothec. Biochem.* **57**(9), 1450-1453, 1993.