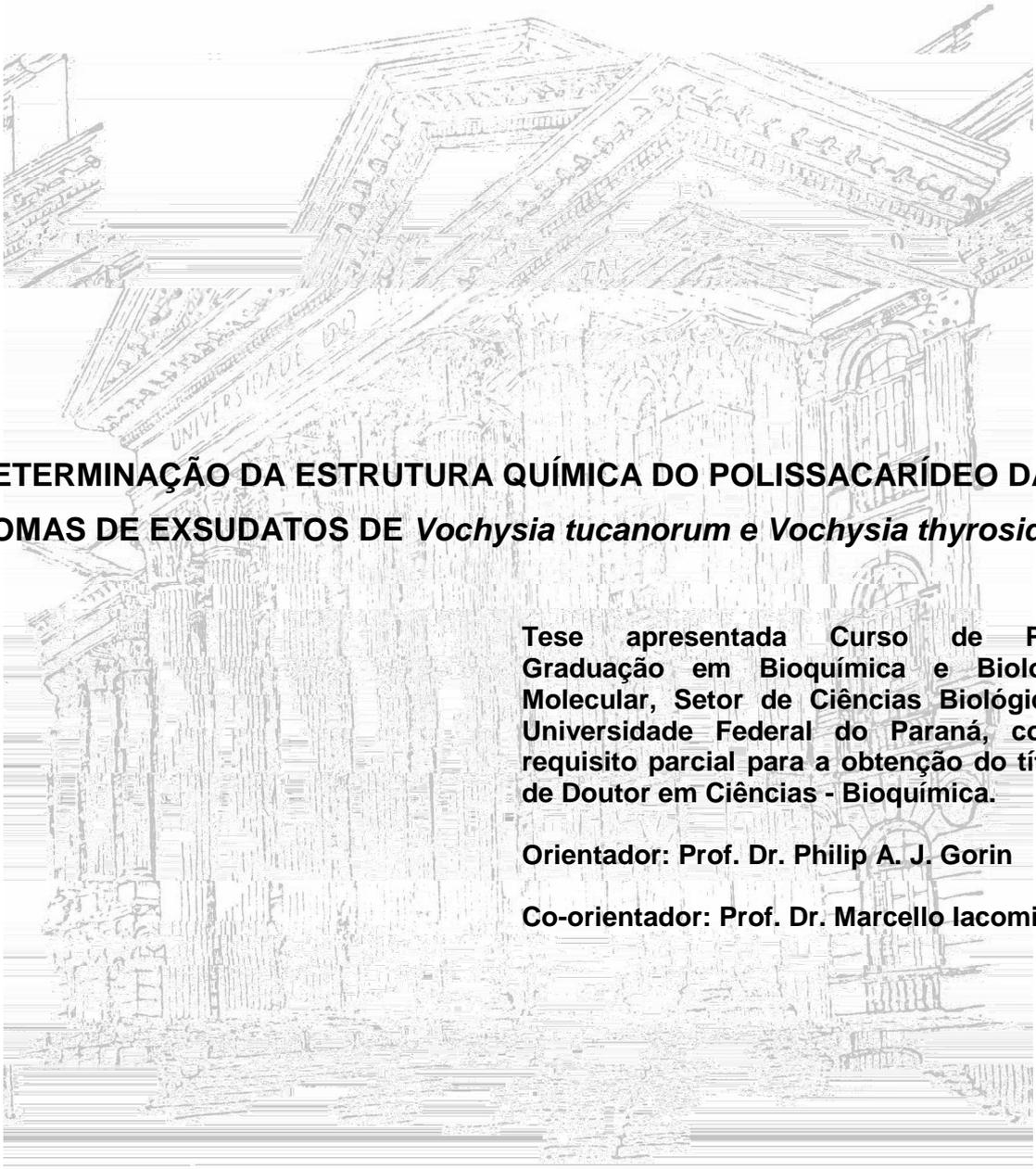


**RICARDO WAGNER**



**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO DAS  
GOMAS DE EXSUDATOS DE *Vochysia tucanorum* e *Vochysia thyrsoidea***

Tese apresentada Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

**CURITIBA**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RICARDO WAGNER**

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO DAS  
GOMAS DE EXSUDATOS DE *Vochysia tucanorum* e *Vochysia thyrosidea***

Tese apresentada Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

**CURITIBA**

**2007**

**RICARDO WAGNER**

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO DAS  
GOMAS DE EXSUDATOS DE *Vochysia tucanorum* E *Vochysia thyrsoidea*.**

Tese aprovada como requiíE rD T8925.1894(r)12.8p233( )-42.3233( )-42.r48(u)0.6444(p)-4.318

Com todo o carinho e amor para Neuza,  
Dionísio, Márcia e Stela. Alicerces que  
me fizeram chegar até aqui.

Com toda a gratidão para uma pessoa que me ensinou a ver a pesquisa com outros olhos, Phil, you are the best!

“Não sei como o mundo me vê, mas eu me sinto como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali, uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita. Tenho sempre diante de mim, ainda por descobrir, o grande oceano da verdade.”

Isaac Newton

## AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, quero agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Philip Albert James Gorin, que sempre foi um entusiasta, uma figura que traduz de boa maneira o significado da expressão “workaholic”. Uma pessoa que antes de ser um orientado é um amigo, uma pessoa extraordinária e sem adjetivos que possam descrevê-lo.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, que foi quem me direcionou para trabalhar com as “gominhas” e sempre acreditou em meu trabalho.

Ao colegiado do curso de Pós-graduação que foi de extrema importância para meu aprendizado e crescimento científico durante todo o período que por aqui permaneci.

Aos coordenadores do curso de Pós-graduação em Bioquímica, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Satie Chubatsu e Prof. Dr. Miguel Daniel Noseda, pelo empenho e dedicação prestados a todos os alunos sem distinção e pelos esforços de manter o reconhecimento deste curso perante a comunidade científica.

A D. Marilza pelo carinho com que sempre me dedicou e pelas palavras de incentivo.

Um agradecimento especial aos Prof. Guilherme e Miguel pela correção prévia deste trabalho. As sugestões deixaram a tese com cara de tese.

Aos amigos do grupo de Química de Carboidratos, Elaine, Andréia, Dirce, Caroline, Lucimara, Lauro e Rodrigo pelos bons momentos. Aos amigos de outros laboratórios Mariana, João, Heide, Carol, Juliana, Luciana e Danilo, muito obrigado pelos ótimos momentos em que estivemos juntos.

Quero agora agradecer a pessoas especiais que fazem de nossa vida ultrapassar a linha tênue do coleguismo para a verdadeira amizade. São pessoas como estas que tornam cada dia mais e mais especial. Estou orgulhoso de ter conquistado tantos amigos de verdade, com os quais posso contar nos momentos bons e naqueles que a gente gostaria que nem tivesse acontecido. Pessoas com as quais você se identifica e quer compartilhar todos os momentos.

Vou colocá-los em ordem alfabética para não discriminar ninguém: Ana Cláudia, Ana Helena, Beatriz, Eduardo, Fernanda, Fhernanda, Flávia, Karen, Leandro, Marcio, Marco André, Marcus, Patrícia, Priscila, Rosane, Solange e Thales.

Desculpem-me aqueles quem não nomeei, mas nestas horas a memória sempre falha....

A CAPES e PRONEX-Carboidratos pelos suporte financeiro durante todo o período de realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Importância das gomas	6
1.2 Estudos de quimiotaxonomia	10
1.3 A Família Vochysiaceae	12
1.3.1 <i>Vochysia tucanorum</i>	13
1.3.2 <i>Vochysia thyrsoidea</i>	13
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>14</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1 Obtenção dos exsudatos	16
3.2 Determinação do grau de hidratação da goma de <i>V. tucanorum</i>	17
3.3 Extração dos polissacarídeos e obtenção dos oligossacarídeos livres redutores	17
3.3.1 Extração dos polissacarídeos da goma de <i>V. tucanorum</i>	17
3.3.2 Extração dos polissacarídeos da goma de <i>V. thyrsoidea</i>	18
3.4 Separação dos polissacarídeos da goma de <i>V. tucanorum</i> por congelamento e degelo	19

3.5 Determinação da homogeneidade e massa molar ( $M_w$ )	20
3.6 Hidrólise parcial dos polissacarídeos das gomas de <i>V. tucanorum</i> (PGD-PVT) e <i>V. thyrsoidea</i> (VTy)	20
3.7 Carboxirredução dos polissacarídeos da goma de <i>V. tucanorum</i> (SGD-PVT e HP4h) e da goma de <i>V. thyrsoidea</i> (VTy e HPy)	21
3.8 Degradação controlada de Smith	23
3.9 Purificação dos oligossacarídeos	24
3.9.1 Oligossacarídeos livres redutores de <i>V. tucanorum</i>	24
3.9.2 Oligossacarídeos produzidos por hidrólise parcial do polissacarídeo VTy da goma de <i>V. thyrsoidea</i>	25
3.10 Análise da composição monossacarídica	25
3.10.1 Hidrólise total	25
3.10.2 Redução e acetilação	26
3.11 Conversão da glucuronolactona formada durante a hidrólise ácida em ácido glucurônico	26
3.12 Dosagem de ácido urônico	27
3.13 Análises de metilação	27
3.14 Hidrólise, redução e acetilação dos produtos per-O-metilados	28
3.15 Métodos analíticos	29
3.15.1 Cromatografia analítica em papel	29
3.15.2 Cromatografia preparativa em papel	29
3.16 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS)	30
3.17 Análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN- $^{13}\text{C}$ )	30
3.18 Espectrometria de massa – ESI-MS ( <i>Electrospray-ionisation-mass-spectrometry</i> )	30

<b>4 RESULTADOS</b>	<b>32</b>
4.1 Polissacarídeo da goma de <i>V. tucanorum</i>	32
4.2 Oligossacarídeos da goma de <i>V. tucanorum</i>	48
4.3 Polissacarídeo da goma de <i>V. thyrsoidea</i>	55
4.4 Oligossacarídeos da goma de <i>V. thyrsoidea</i>	68
4.5 Perspectivas	76
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>89</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Representação esquemática da arabinogalactana, presente na goma de Angico-Branco ( <i>Anadenanthera colubrina</i> ), com ligações $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Ramificações na cadeia principal em C-6 por cadeias laterais de galactose, arabinose, ácido urônico e ramnose-----	2
FIGURA 2:	Representação esquemática da arabinogalactana, presente na goma de cajueiro ( <i>Anacardium occidentale</i> ), com ligações $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Ramificações na cadeia principal em C-6 por cadeias laterais de galactose e terminais não redutores de arabinose e ácido glucurônico-----	3
FIGURA 3:	Representação esquemática da heteroxilana, presente na goma de <i>Scheelea phalerata</i> (uricuri), com ligações $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Ramificações na cadeia principal em O-2 ou O-3 por unidades de arabinose e xilose-----	4
FIGURA 4:	Representação esquemática da glucuronomanana, presente na goma de <i>Vochysia lehmannii</i> (quaruba), com ligações $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ alternadas-----	5
FIGURA 5:	Exsicata (A) e fotos dos frutos secos (B) de <i>Vochysia tucanorum</i> -----	12
FIGURA 6:	Fotos da goma de <i>Vochysia tucanorum</i> -----	33
FIGURA 7:	Fluxograma de extração e purificação do polissacarídeo da goma de <i>Vochysia tucanorum</i> -----	35
FIGURA 8:	Perfil de eluição por HPSEC-MALLS dos polissacarídeos nativo PVT. As frações PVTQ e PVTK tiveram o mesmo perfil de eluição----	35
FIGURA 9:	Fluxograma de obtenção das frações a partir do polissacarídeo da goma de <i>Vochysia tucanorum</i> -----	36
FIGURA 10:	Perfil de eluição por HPSEC-MALLS das frações SGD e PGD-PVT obtidas após processo de congelamento e degelo-----	37
FIGURA 11:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da região de carbono anomérico do polissacarídeo nativo (PVT). Análise realizada com probe de 5 mm, 50 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm-----	39

FIGURA 12:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C dos polissacarídeos obtidos após degradação controlada de Smith (S <sub>1</sub> SGD e S <sub>1</sub> PGD). Análise realizada com probe de 5 mm, 50 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.-----	40
FIGURA 13:	Espectro se RMN- <sup>13</sup> C das frações HP4230 (A) e HP4h (B), obtidas após hidrólise parcial. Análise realizada com probe de 5 mm, 50 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm----	43
FIGURA 14:	Perfil de fragmentação de massa em análise por GC-MS da amostra HP4h, reduzida com NaBD <sub>4</sub> -----	44
FIGURA 15:	Cromatografia em camada delgada (TLC) das frações obtidas da coluna de carvão/celite, fase móvel 4:2:2:1 (n-BuOH:HOAc:EtOAc:H <sub>2</sub> O), corrida de 7 cm-----	48
FIGURA 16:	Perfil de eluição da cromatografia de gel permeação em Sephadex LH20 dos oligossacarídeos obtidos da coluna de carvão/Celite. Volume morto de 13 mL, volume total de 60 mL. Coluna eluída com água destilada-----	49
FIGURA 17:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (A), HMQC (B), COSY (C) e TOCSY (D) obtidos para o Oligo-2. Análise realizada com probe de 5 mm, 70 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm----	51
FIGURA 18:	Espectros de RMN- <sup>13</sup> C (A), HMQC (B), COSY (C) e TOCSY (D) obtidos para o Oligo-4. Análise realizada com probe de 5 mm, 70 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm----	53
FIGURA 19:	Espectro de ESI-MS para o Oligo-4. Scan realizado no modo positivo (A) e fragmentação do íon molecular com relação m/z 893 (B). Em (C) tem-se a estrutura proposta para este oligossacarídeo---	54
FIGURA 20:	Fotos da goma de <i>Vochysia thyrsoidea</i> -----	56
FIGURA 21:	Fluxograma de obtenção das frações de polissacarídeo da goma de exsudato de <i>V. thyrsoidea</i> -----	57
FIGURA 22:	Perfil de eluição por HPSEC da fração VTY de <i>V. thyrsoidea</i> , utilizando detector de índice de refração (RI)-----	58
FIGURA 23:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C do polissacarídeo obtido da goma de <i>V. thyrsoidea</i> (VTy). Análise realizada com probe de 5 mm, 50 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm -----	60

FIGURA 24:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da fração HPy, obtida após a hidrólise parcial de VTy. Análise realizada com probe de 5 mm, 50 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm -----	61
FIGURA 25:	Cromatografia em camada delgada (TLC) das frações HPy (tratada e não tratada com NH <sub>4</sub> OH) e Y-CR <sub>3</sub> hidrolisadas com TFA 1 M por 8 h a 100 °C. Padrões de glucuronolactona, ácido glucurônico, manose e glucose. Fase móvel 4:2:21 (1-ProOH:EtOAC:HOAC:H <sub>2</sub> O), revelada com orcinol-----	62
FIGURA 26:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da fração HPy (A) e HPy-CR (B), obtidas após a hidrólise parcial de VTy e carboxirredução da fração HPy, respectivamente. Análise realizada com probe de 5 mm, 50 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm -----	64
FIGURA 27:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C das frações Y-CR <sub>3</sub> (A) e Sy-CR <sub>3</sub> (B), obtidas após a carboxirredução de VTy e após degradação controlada de Smith de Y-CR <sub>3</sub> , respectivamente. Análise realizada com probe de 5 mm, 50 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm-----	65
FIGURA 28:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (A), HMQC (B), COSY (C), TOCSY (D) e ROESY (E) do oligossacarídeo R08-Y isolado por hidrólise parcial do polissacarídeo VTy da goma de <i>V. thyrsoidea</i> . Análise realizada com probe de 5 mm, 70 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm -----	70
FIGURA 29:	Espectro de ESI-MS do oligossacarídeo R08-Y em modo negativo. O íon molecular é mostrado em (A) e a fragmentação do íon molecular em (B)-----	72
FIGURA 30:	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (A), HMQC (B), COSY (C), TOCSY (D) e ROESY (E) do oligossacarídeo R03-Y isolado por hidrólise parcial do polissacarídeo VTy da goma de <i>V. thyrsoidea</i> . Análise realizada com probe de 5 mm, 70 °C, em D <sub>2</sub> O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm -----	74
FIGURA 31:	Espectro de ESI-MS do oligossacarídeo R03-Y em modo negativo. O íon molecular é mostrado em (A) e a fragmentação do íon molecular de <i>m/z</i> 693 em (B)-----	75
FIGURA 32:	Ilustrações mostrando o bloco continental denominado Pangea antes da separação continental-----	78

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Fontes de goma arábica em 12 países africanos participantes do projeto de controle de qualidade da FAO-----	7
TABELA 2:	Seleção de mercadorias exportadas da Nigéria (média de 1998-2000 – em toneladas)-----	9
TABELA 3:	Propriedades físico-químicas das gomas de exsudato de algumas espécies de <i>Acacia</i> das séries Vulgares e Gummiferae-----	11
TABELA 4:	Composição monossacarídica das frações obtidas da goma de <i>V. tucanorum</i> , após purificação por congelamento e degelo-----	37
TABELA 5:	Composição monossacarídica das frações obtidas da goma de <i>V. tucanorum</i> , após purificação por congelamento e degelo (SGD-PVT e PGD-PVT) e daquelas obtidas após um ciclo de degradação controlada de Smith (SSGD e SPGD)-----	39
TABELA 6:	Composição monossacarídica das frações obtidas da goma de <i>V. tucanorum</i> , após hidrólise ácida parcial-----	41
TABELA 7:	Composição monossacarídica das frações carboxirreduzidas obtidas da fração SGP-PVT de <i>V. tucanorum</i> -----	45
TABELA 8:	Análises de metilação das frações de <i>V. tucanorum</i> : alditóis acetatos neutros parcialmente O-metilados obtidos das frações per-O-metiladas-----	47
TABELA 9:	Deslocamentos químicos para carbono e próton obtidos para o Oligo-2-----	49
TABELA 10:	Composição monossacarídica das frações obtidas do polissacarídeo da goma de <i>V. thyrsoidea</i> -----	59
TABELA 11:	Análises de metilação das frações polissacarídicas da goma de <i>V. thyrsoidea</i> : alditóis acetatos neutros parcialmente O-metilados obtidos das frações per-O-metiladas-----	66
TABELA 12:	Assinalamentos definitivos de alguns carbono e próton para o oligossacarídeo R03-Y a partir dos espectros de RMN- <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H, HMQC, COSY e TOCSY-----	73

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta$	-	Deslocamento químico
$^{13}\text{C}$	-	Carbono treze
$^1\text{H}$	-	Próton não hidrogênio
AG	-	Arabinogalactana
Ara	-	Arabinose
Ac <sub>2</sub> O	-	Anidrido acético
<i>n</i> -BuOH	-	<i>n</i> -butanol
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CH <sub>3</sub> I	-	Iodeto de metila
CHCl <sub>3</sub>	-	Clorofórmio
COSY	-	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d.i.	-	Diâmetro interno
D <sub>2</sub> O	-	Óxido de deutério
EtOAc	-	Acetato de etila
<i>f</i>	-	Furanosídico
Gal	-	Galactose
GC-MS	-	Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa
Glc	-	Glucose
GlcA	-	Ácido glucurônico
HMQC	-	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy</i>
HOAc	-	Ácido acético
HPSEC-MALLS	-	Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz
RI	-	Índice de refração
Da	-	Daltons
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
Man	-	Manose
Me	-	Metil
Me <sub>2</sub> SO	-	Dimetilsulfóxido

Me <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Dimetilsulfato
M <sub>w</sub>	-	<i>Molecular Weigth (peso molecular)</i>
NaBH <sub>4</sub>	-	Borohidreto de sódio
NaBD <sub>4</sub>	-	Borohidreto de sódio deuterado
<i>p</i>	-	Piranosídico
p/v	-	Peso/volume
pH	-	Potencial hidrogeniônico
ppm	-	Partes por milhão
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	-	<i>Rotational Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
rpm	-	Rotações por minuto
TFA	-	Ácido trifluoroacético
TOCSY	-	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
v/v	-	Volume/volume
Xil	-	Xilose

### SIGLAS DAS FRAÇÕES

PVT	-	Polissacarídeo de <i>V. tucanorum</i> da extração aquosa à temperatura ambiente
PVTQ	-	Polissacarídeo de <i>V. tucanorum</i> da extração aquosa à 80 °C
PVTK	-	Polissacarídeo de <i>V. tucanorum</i> da extração alcalina com KOH
SGD-PVT	-	Polissacarídeo do sobrenadante de congelamento e degelo
PGD-PVT	-	Polissacarídeo do precipitado de congelamento e degelo
S1-SGD	-	Polissacarídeo da primeira degradação controlada de Smith em SGD-PVT
S2-SGD	-	Polissacarídeo da segunda degradação controlada de Smith em SGD-PV
CR1-SGD	-	Polissacarídeo após 1 ciclo de carboxirredução
CR2-SGD	-	Polissacarídeo após 2 ciclos de carboxirredução
HP4-PVT	-	Polissacarídeo hidrolisado durante 4 h com TFA 0,1M

HP42-PVT	- Polissacarídeo hidrolisado durante 2 h com TFA 0,5M
HP4230	- Polissacarídeo hidrolisado durante 30 minutos com TFA 0,5M
HP4h	- Polissacarídeo hidrolisado durante 4 h com TFA 0,5M
VTy	- Polissacarídeo da goma de <i>V. thyrsoidea</i>
S1Y	- Polissacarídeo da primeira degradação controlada de Smith
S2Y	- Polissacarídeo da segunda degradação controlada de Smith
HPy	- Polissacarídeo hidrolisado com TFA 0,5M durante 4 h
HP-CR	- Polissacarídeo hidrolisado e carboxirreduzido
CR3y	- Polissacarídeo após 3 ciclos de carboxirredução
SMT-CRY	- Polissacarídeo da degradação de Smith de CR3y
RO3-Y	- Oligossacarídeo com $R_{lact}$ de 0,3
R08-Y	- Oligossacarídeo com $R_{lact}$ de 0,8

## RESUMO

O polissacarídeo da goma de *Vochysia tucanorum* foi obtido por extração aquosa a temperatura ambiente (PVT), aquosa a quente (PVTQ) e por extração alcalina (PVTK). Todas as frações apresentaram-se heterogêneas por HPSEC-MALLS e foram submetidas ao processo de purificação por congelamento e degelo, através do qual foram isolados 2 componentes com massas moleculares diferentes ( para todas as frações. Em seguida as frações sobrenadante de congelamento e degelo foram reunidas, assim como as frações precipitado de congelamento e degelo, pois possuíam composições monossacarídicas e espectros de RMN muito semelhantes e foram agora denominadas de SGD-PVT e PGD-PVT, com  $M_w$  350.000 e 520.000 g/mol respectivamente. As duas frações foram submetidas à degradação controlada de Smith, expondo cadeias laterais de  $\beta$ -Galp 3-O substituídas, e demonstrando que as unidades de arabinose estão localizadas periféricamente no polissacarídeo. Através de hidrólises ácidas parciais foi verificada a presença de uma glucuronomanana como cadeia principal, dado este confirmado através de análises de RMN, metilação e carboxirredução. A análise dos derivados metilados da fração carboxirreduzida mostrou a presença de  $\beta$ -D-Glcp 4-O substituída, revelando que as unidades de  $\beta$ -D-GlcpA encontram-se ligadas em O-4. Do sobrenadante etanólico foram isolados dois oligossacarídeos, uma  $\beta$ -D-xilana 4-O substituída e uma mistura de oligossacarídeos com um componente em maior proporção que corresponde a Ara<sub>4</sub>Hex<sub>2</sub>. A extração do polissacarídeo da goma de *Vochysia thyrsoidea* foi realizada apenas por extração aquosa a temperatura ambiente. Este polissacarídeo (VTy) foi submetido a degradações controladas de Smith e hidrólise ácida parcial. Os polissacarídeos gerados foram analisados por RMN e metilação. A estrutura encontrada foi uma glucuronomanana. Os dois polissacarídeos estudados possuem na cadeia principal a unidade repetitiva  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ , onde as unidades de manose estão substituídas em O-3 por cadeias laterais de  $\beta$ -D-Gal 3-O substituídas, sendo estas cadeias laterais ainda substituídas por cadeias menores, ou unidades simples, de  $\alpha$ -L-Araf. As unidades de  $\beta$ -D-GlcpA quando encontram-se substituídas também em O-3. A

edictama -sapuúdr(m)e)0.883151(i)-9.3957(m)-9.94614(p)-9.39763( )-40.6778a2(o)0.88562(b)0.88

## ABSTRACT

Extractions of the gum exudate of *Vochysia tucanorum* were carried out with water at 25 °C to give polysaccharide PVT, at 80 °C to give PVTQ, and with aqueous KOH at 25 °C give PVTK. Each fraction was heterogeneous and was submitted to freeze-thawing, providing soluble and insoluble fractions which were homogeneous and had similar contents of arabinose, mannose, glucose, galactose, and glucuronic acid. Due to their higher yield, monosaccharide contents, methylation data, and <sup>13</sup>C-NMR spectra, insoluble (PGD-PVT) and soluble fractions SGD-PVT, were selected for more detailed studies. These contained similar chemical structures, although different  $M_w$  520,000 and 350,000 g/mol, respectively). Mild acid hydrolysis of PGD-PVT removed *Araf* units, revealing a core (HP4-PVT) containing nonreducing end- and 3-O-substituted units of  $\beta$ -D-Galp and 2-O- and n 3.39512(l).R.0484(e)-9.39578 -14.3634 x9IR.0484(e)-9.39578 -1502(a)0.88

## 1 INTRODUÇÃO

O termo goma, de um modo geral, é usado para definir os produtos de natureza polissacarídica que são exsudatos vegetais, geralmente resultantes de traumatismos. Estas gomas se acumulam em lacunas situadas em diferentes tecidos que, quando feridos, exsudam. Os fatores elicitores da biossíntese das gomas estão bem estabelecidos quanto a evidente influência das condições de estresse na casca das árvores produtoras, incluindo injúria física, ataque de microorganismos, períodos de estiagem e outros fatores ambientais. A biossíntese destas estruturas complexas depende de uma ampla cascata enzimática, além da eventual participação de fungos e outros microorganismos no processo, estimulando ainda mais a produção dos exsudatos (SANDFORD e BAIRD, 1983).

F. SMITH e J.K.N. JONES (1949) definem as gomas da seguinte maneira:

*“Substâncias originárias de plantas que são obtidas como exsudações dos frutos, troncos ou galhos das árvores, espontaneamente, ou depois de injúria mecânica da planta, podendo ocorrer por incisão da casca, ou pela remoção de um galho, ou depois ainda de invasão por fungo ou bactéria.”*

Estas gomas de exsudatos são constituídas principalmente por polissacarídeos produzidos, principalmente, por um grande número de plantas e que são facilmente vistos nos troncos das árvores, como massas de cor variável e às vezes secas. Elas não são produzidas exclusivamente nos troncos, mas também nos galhos e frutos e aparecem, na maioria dos casos, como mecanismos de defesa da planta. BELESKI-CARNEIRO et al. (1999) estudando a goma dos frutos de *Chorisia speciosa*, relata que esta goma era produzida após a injúria mecânica nos frutos e que esta é muito similar a goma arábica e diferente da goma do tronco que é uma glucuronomanana.

A maioria das gomas estudadas até hoje são de Angiospermas, mas também são descritos estudos para Gimnospermas. As principais famílias que tiveram seus exsudatos pesquisados são: Anacardiaceae, Bromeliaceae, Burseraceae, Cactaceae, Combretaceae, Coniferaceae, Gnetaceae, Leguminoseae, Meliceae, Umbelíferae, Proteaceae, Rosaceae, Rutaceae, Sapotaceae e Sterculiaceae. Dentre estas a mais

estudada é a família Leguminosae, onde se encontra a Goma Arábica e muitas outras Acácias (MENESTRINA, 1999).

A composição dos exsudatos é muito variada de espécie para espécie, alguns são de composição muito complexa e isto torna o seu estudo cada vez mais interessante. STODDART e JONES (1968) trabalhando com a goma do limão (*Citrus limonia*) detectaram a presença de uma galactana altamente ramificada com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) dispostas de maneira não ordenada, com ramificações de ramnose, ácido glucurônico e arabinose. DELGOBO et al. (1998) pesquisou a goma nativa de Angico Branco (*Anadenanthera colubrina*) e descreve o polissacarídeo como uma estrutura extremamente complexa (FIGURA 1), que contém 26 sinais na região de H-1 por RMN-<sup>1</sup>H e 20 sinais na região de C-1 por RMN-<sup>13</sup>C, o polissacarídeo em questão trata-se de uma arabinogalactana, onde a cadeia principal é composta de unidades de (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -galactopiranosose e variados tipos de cadeias laterais.

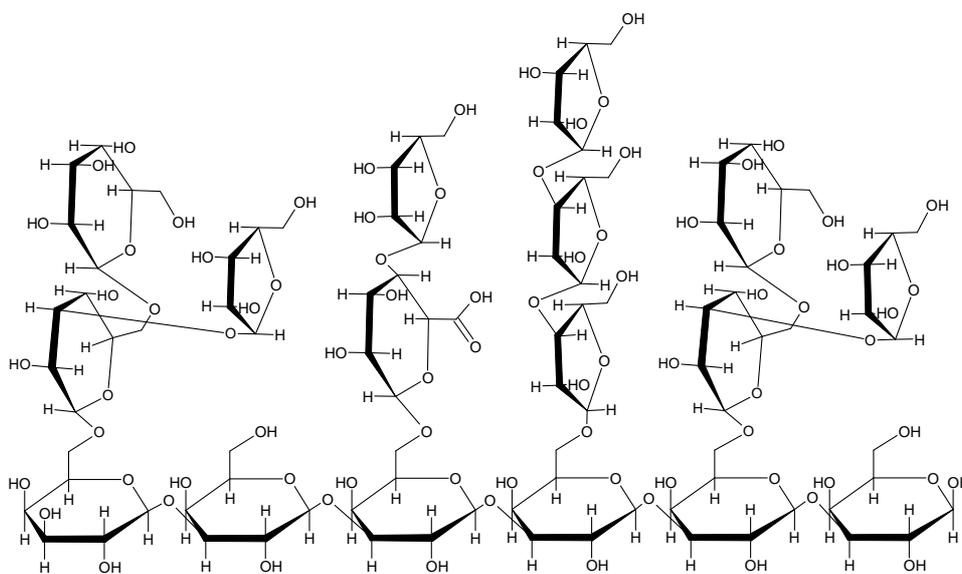


FIGURA 1: Representação esquemática da arabinogalactana, presente na goma de Angico-Branco (*Anadenanthera colubrina*), com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Ramificações na cadeia principal em C-6 por cadeias laterais de galactose, arabinose, ácido urônico e ramnose.

Com a mesma complexidade se apresenta a goma nativa do cajueiro, *Anacardium occidentale*, (MENESTRINA et al., 1998). Uma heterogalactana ácida (FIGURA 2) que apresenta como cadeia principal unidades de galactose unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), onde se encontram cadeias laterais de  $\beta$ -D-Galp com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) e como terminais não redutores unidades de  $\alpha$ -L-Araf e  $\beta$ -D-GlcpA.

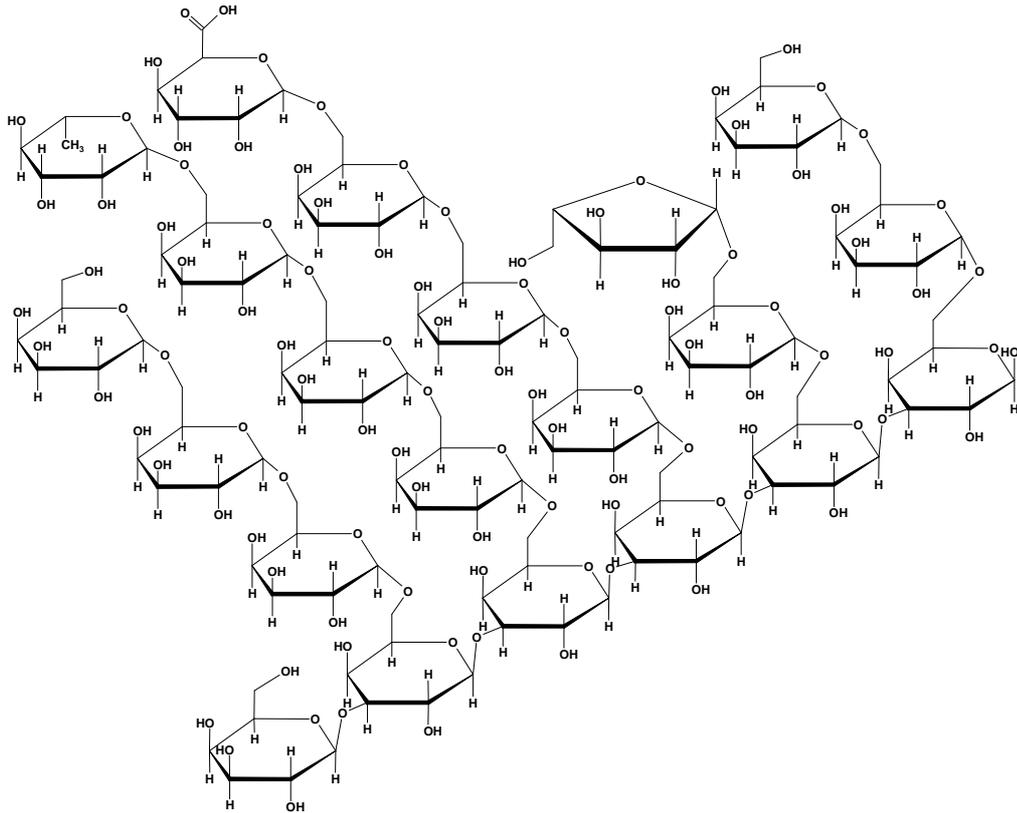


FIGURA 2: Representação esquemática da arabinogalactana, presente na goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*), com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Ramificações na cadeia principal em C-6 por cadeias laterais de galactose e terminais não redutores de arabinose e ácido glucurônico.

LEÓN DE PINTO et al. (1998) isolou um polissacarídeo do exsudato de *Laguncularia racemosa*. Devido a sua complexidade, os autores utilizaram degradações controladas de Smith obtendo-se diversas moléculas por este processo, dentre eles um pentassacarídeo. O mesmo pentassacarídeo foi obtido por hidrólise ácida parcial,

sugerindo que o mesmo faça parte da cadeia principal, corroborando com os resultados obtidos de estruturas complexas de gomas, como foi sugerido por ASPINALL (1969).

Mais recentemente, TISCHER et al. (2002a) estudaram os oligossacarídeos livres e redutores da goma arábica e desta maneira contribuíram para a elucidação da estrutura tão complexa desta goma. TISCHER et al. (2002b) também estudaram o polissacarídeo da goma Ghatti. Este polissacarídeo tem sido estudado exaustivamente por vários pesquisadores e, mesmo assim, os autores encontraram algumas diferenças em relação ao que já foi publicado, dentre elas pode-se citar a substituição em O-4 das unidades de  $\beta$ -Glc $\rho$ A por unidades de  $\alpha$ -Rhap.

Outras gomas vegetais estudadas foram as gomas das palmeiras jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e leque-chinês (*Livistona chinensis*). Os dois polissacarídeos apresentam-se como heteroxilanas altamente substituídas. Em dados publicados por MAURER-MENESTRINA et al. (2003), o polissacarídeo de leque-chinês apresenta terminais não redutores de  $\alpha$ -L-Fuc $\rho$  substituindo em posição 2 unidades de L-Araf e/ou L-Arap. SIMAS et al (2006), estudando o polissacarídeo de jerivá, encontraram o mesmo padrão de substituição, característico para polissacarídeos das gomas da família Arecaceae. SIMAS (2004) estudou a goma de *Scheelea phalerata* (Uricuri) e mais uma vez encontrou uma xilana altamente substituída (FIGURA 3) com unidades de fucose terminal, indicando uma forte característica desta família e corroborando com a hipótese anteriormente sugerida.

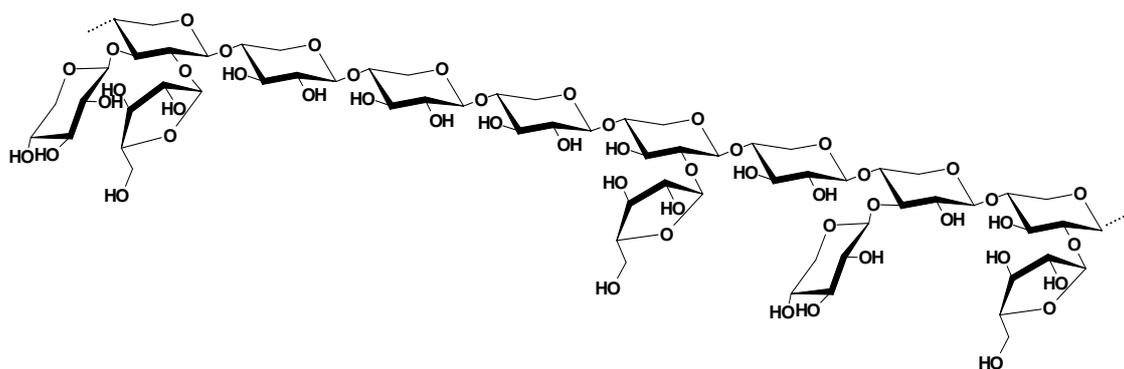


FIGURA. 3: Representação esquemática da heteroxilana, presente na goma de *Scheelea phalerata* (Uricuri), com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Ramificações na cadeia principal em O-2 ou O-3 por unidades de arabinose e xilose.

WAGNER et al. (2003) estudando a goma de *Vochysia lehmannii* (Quaruba), uma planta amplamente encontrada no Brasil desde a Amazônia até o norte do Paraná, encontrou um polissacarídeo com espectro de RMN-<sup>13</sup>C muito simples com apenas dois sinais na região de carbono anomérico, o que é incomum para polissacarídeos de gomas. Este detalhe despertou o interesse para a determinação estrutural deste polissacarídeo, onde foi encontrada uma glucuronomanana (FIGURA 4) de estrutura muito simples e pouco ramificada. Esta glucuronomanana possui em sua cadeia principal unidades de  $\alpha$ -D-Manp, substituída em O-2, e unidades de  $\beta$ -D-GlcpA, substituídas em O-4, alternadas. Algumas unidades de manose podem ser substituídas em O-3 por unidades de arabinofuranose ou arabinopiranosose e estas substituídas por unidades de glucopiranosose.

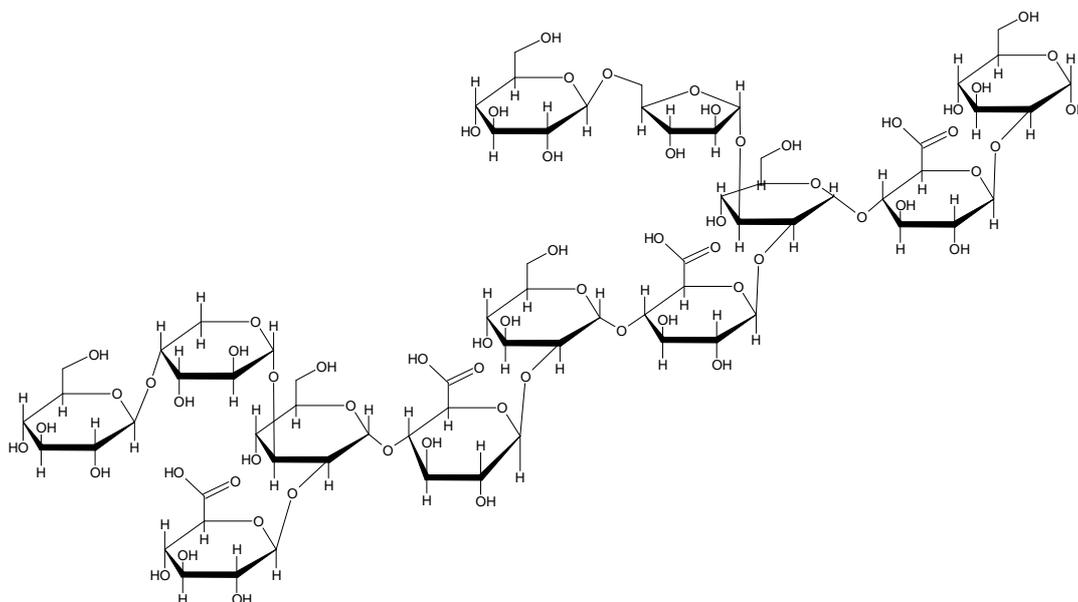


FIGURA. 4: Representação esquemática da glucuronomanana, presente na goma de *Vochysia lehmannii* (Quaruba), com ligações  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-GlcpA(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ ) alternadas.

## 1.1 Importância das gomas

Há milhares de anos que os exsudatos vegetais, incluindo as gomas, são conhecidos e manipulados com diversos fins, desde os antigos egípcios que as utilizavam nos preparados para a mumificação até os dias atuais onde elas são componentes de manipulações farmacêuticas, tanto alopáticas quanto cosméticas. Além de serem utilizadas em diversos segmentos industriais, principalmente, por suas propriedades geleificantes e entre estas indústrias podemos citar as indústrias de detergentes, têxtil, de adesivos, de papel, de tintas e a alimentícia (WHISTLER, 1993; RODRIGUES, PAULA e COSTA, 1993). Nestas indústrias as gomas utilizadas têm diversas finalidades como agentes espessantes, geleificantes, emulsificantes, floculantes, clarificantes, encapsuladores, estabilizadores de espuma e suspensões, entre outras (BeMILLER, 1987).

Tomando por base a goma arábica, exsudato produzido nos galhos e troncos da *Acacia senegal* (Wildenow) ou outras espécies relacionadas de *Acácia* spp. (Família Leguminosae), atualmente mais de 70% do fornecimento mundial desta goma é proveniente do Sudão. As outras áreas produtoras são o Chade, a Nigéria, Senegal, Mali, Mauritânia e o Niger (CHIKAMAI, 1997).

Alguns dados de produção e comercialização destas gomas estão disponíveis e é possível verificar que em grande parte os países do continente africano dominam este mercado. Somente a Nigéria comercializou apenas em goma bruta, sem refinamento, US\$ 26 milhões em 2004 e a expectativa de crescimento é para US\$ 30 milhões em 2010. Se a goma arábica é refinada antes de ser comercializada estes valores aumentam e foram da ordem de US\$ 103 milhões em 2004 e com expectativa de ser US\$ 120 milhões em 2010 (ABDULLAHI, 2004). Este crescente mercado faz do Brasil um potencial produtor, devido a sua flora vastíssima e ainda pouco explorada.

TABELA 1: Fontes de goma arábica em 12 países africanos participantes do projeto de controle de qualidade da FAO.

País	Acácias utilizadas para produção de AG comercial	Métodos de obtenção da AG				
		Fonte da AG produzida		Acácias utilizadas para produção de AG comercial	Fonte da AG produzida	
		<u>1</u>	<u>2</u>		<u>3</u>	<u>4</u>
<b>Burkina Faso</b>	<i>A. senegal</i> <i>A. laeta</i> <i>A. seyal</i> <i>A. gourmaensis</i> <i>A. dudgeoni</i> <i>A. raddiana</i>	**	** ** ** ** ** **	<i>A. senegal</i> <i>A. laeta</i> <i>A. seyal</i> <i>A. gourmaensis</i> <i>A. dudgeoni</i> <i>A. raddiana</i>		** ** ** ** ** *
<b>Mali</b>	<i>A. senegal</i> <i>A. laeta</i> <i>A. seyal</i> <i>A. polyacantha</i> <i>A. raddiana</i>	** **	** ** ** ** **	<i>A. senegal</i> <i>A. laeta</i> <i>A. seyal</i> <i>A. polyacantha</i> <i>A. raddiana</i>	** **	** ** ** ** **
<b>Mauritânia</b>	<i>A. senegal</i> <i>A. laeta</i> <i>A. seyal</i> <i>A. macrostachya</i>	**	** ** ** **	<i>A. senegal</i> <i>A. laeta</i> <i>A. seyal</i> <i>A. macrostachya</i>	**	** ** ** **
<b>Senegal</b>	<i>A. senegal</i> <i>A. ehrenbergiana</i> <i>A. laeta</i> <i>A. macrostachya</i> <i>A. macrothyrsa</i> <i>A. nilitica</i> <i>A. polyacanthat</i> <i>A. sieberana</i> <i>A. tortilis</i>	**	** ** ** ** ** ** ** ** **	<i>A. senegal</i> <i>A. ehrenbergiana</i> <i>A. laeta</i> <i>A. macrostachya</i> <i>A. macrothyrsa</i> <i>A. nilitica</i> <i>A. polyacanthat</i> <i>A. sieberana</i> <i>A. tortilis</i>	** **	** ** ** ** ** ** ** ** **
<b>Sudão</b>	<i>A. senegal</i> var. <i>senegal</i> <i>A. seyal</i> var. <i>seyal</i>	**	** **	<i>A. senegal</i> var. <i>senegal</i> <i>A. seyal</i> var. <i>seyal</i>	**	 **
<b>Etiópia</b>	<i>A. senegal</i> var. <i>senegal</i> <i>A. senegal</i> var. <i>kerensis</i> <i>A. seyal</i> var. <i>seyal</i> <i>A. seyal</i> var. <i>fistula</i> <i>A. polyacanthat</i> <i>A. drepanolobium</i>	**	** ** ** ** ** **	<i>A. senegal</i> var. <i>senegal</i> <i>A. senegal</i> var. <i>kerensis</i> <i>A. seyal</i> var. <i>seyal</i> <i>A. seyal</i> var. <i>fistula</i> <i>A. polyacantha</i> <i>A. drepanolobium</i>	**	** ** ** ** ** **
<b>Quênia</b>	<i>A. senegal</i> var. <i>kerensis</i> <i>A. paoli</i>		** **	<i>A. senegal</i> var. <i>kerensis</i> <i>A. paoli</i>		** **

liofilizada. O rendimento desta fração foi de 12% (24 g de polissacarídeo em relação ao peso de goma úmida).

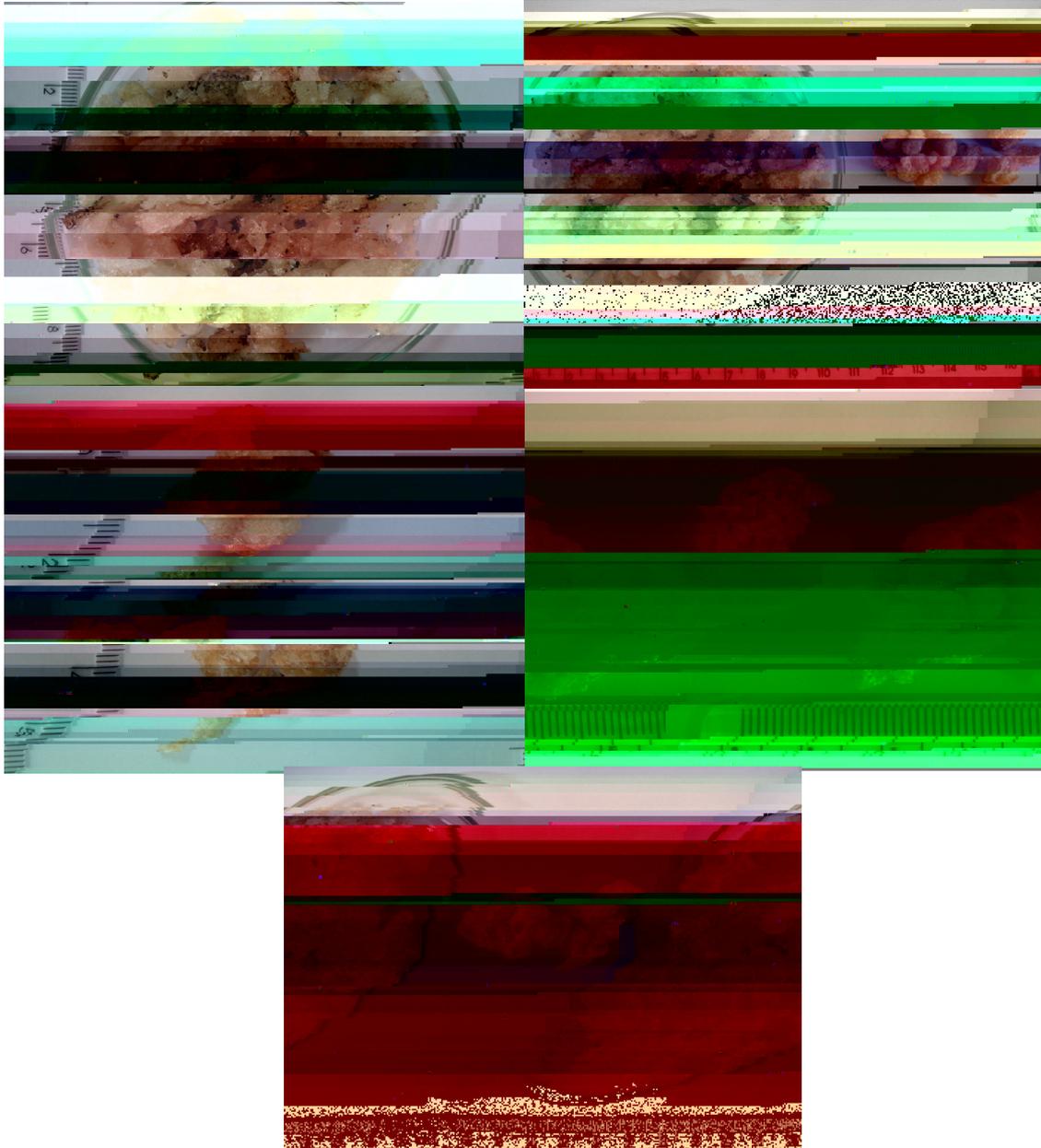


FIGURA 6: Fotos da goma de *Vochysia tucanorum*.

Com a finalidade de obter maior quantidade de polissacarídeos, as partículas de goma que não solubilizaram na extração aquosa à quente foram submetidas a extração alcalina à temperatura ambiente. Utilizou-se 1 L de solução aquosa de KOH 1% e adicionou-se aproximadamente 50 mg de NaBH<sub>4</sub> para proteger as pontas reductoras dos polissacarídeos. Nesta etapa ocorreu uma completa solubilização da goma. A solução resultante foi neutralizada com ácido acético, concentrada em evaporador rotatório até 300 mL e adicionada a 3 volumes de etanol para a precipitação dos polissacarídeos, que foram removidos por centrifugação, gerando a fração PVTK, que foi dialisada em membrana de 12-14.000 Da contra água corrente e liofilizada. O rendimento desta fração foi de 3% (6,0 g de polissacarídeo em relação ao peso de goma úmida).

Após as etapas de extração dos polissacarídeos, o primeiro experimento a ser realizado foi a determinação da homogeneidade através de HPSEC-MALLS. Os perfis de eluição obtidos para PVT e PVTQ foram idênticos e mostraram amostras heterogêneas, pois foram visualizados dois picos (FIGURA 8) utilizando o detector de índice de refração (IR). Este experimento não foi realizado para a fração PVTK, pois esta não era solúvel em água. Este perfil heterogêneo levou a um primeiro passo de purificação por congelamento e degelo, onde a amostra é solubilizada em água destilada, depois é congelada e descongelada várias vezes, centrifugada para separar a parte solúvel da parte não solúvel em água fria, até que no sobrenadante deste procedimento não seja visualizado mais a presença de precipitado ao se descongelar o material. Desta maneira, realizou-se este procedimento para PVT e PVTQ, de onde foram obtidas duas subfrações: sobrenadante de congelamento e degelo (SGD-PVT e SGD-PVTQ) e precipitado de congelamento e degelo (PGD-PVT e PGD-PVTQ). Na FIGURA 9 encontram-se resumidos os processamentos realizados com cada fração.

Um novo experimento de HPSEC-MALLS foi realizado para estas frações obtidas e verificou-se que agora as amostras estavam homogêneas, pois com este procedimento simples de purificação utilizado foi possível separar os dois picos antes encontrados na amostra original (FIGURA 10).

Com as frações foi possível determinar seu peso molecular. Primeiramente foi determinada a constante  $dn/dc$  para cada molécula e em seguida através do software do próprio equipamento chegou-se à massa molecular média das moléculas ( $M_w$ ). A

fração SGD-PVT teve uma  $M_w$  de 350.000 g/mol ( $dn/dc = 0,134$ ), enquanto PGD-PVT 520.000 g/mol ( $dn/dc = 0,139$ ).

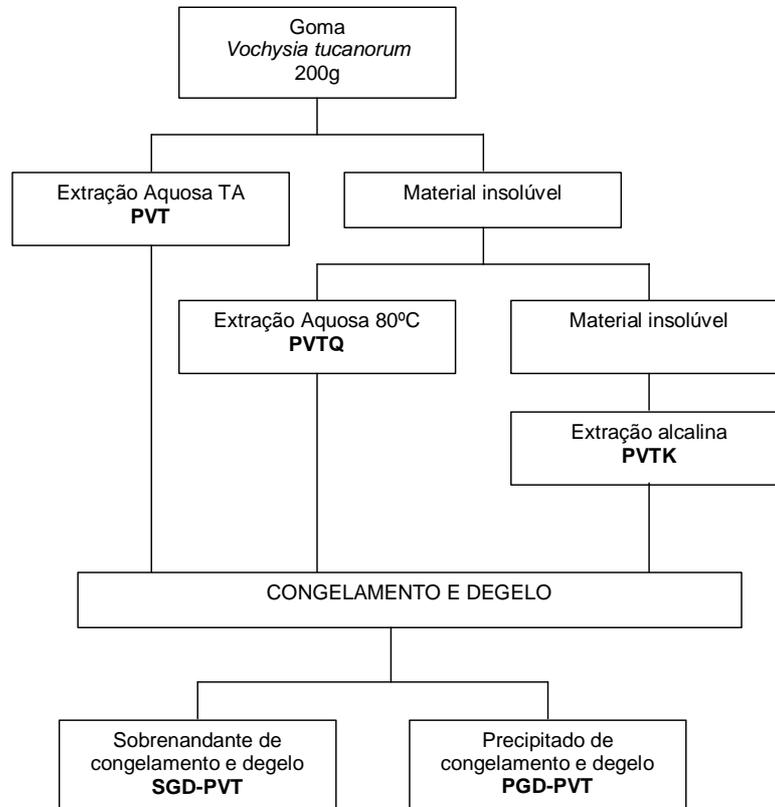


FIGURA 7: Fluxograma de extração e purificação do polissacarídeo da goma de *Vochysia tucanorum*

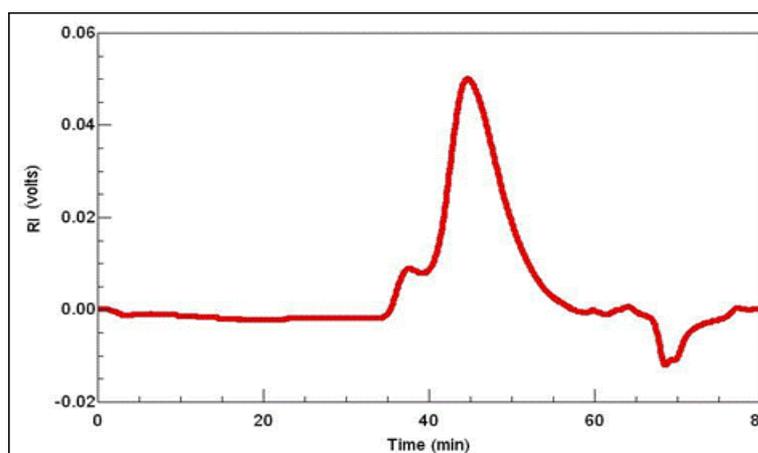


FIGURA 8: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS do polissacarídeo nativo PVT. As frações PVTQ e PVTK tiveram o mesmo perfil de eluição.

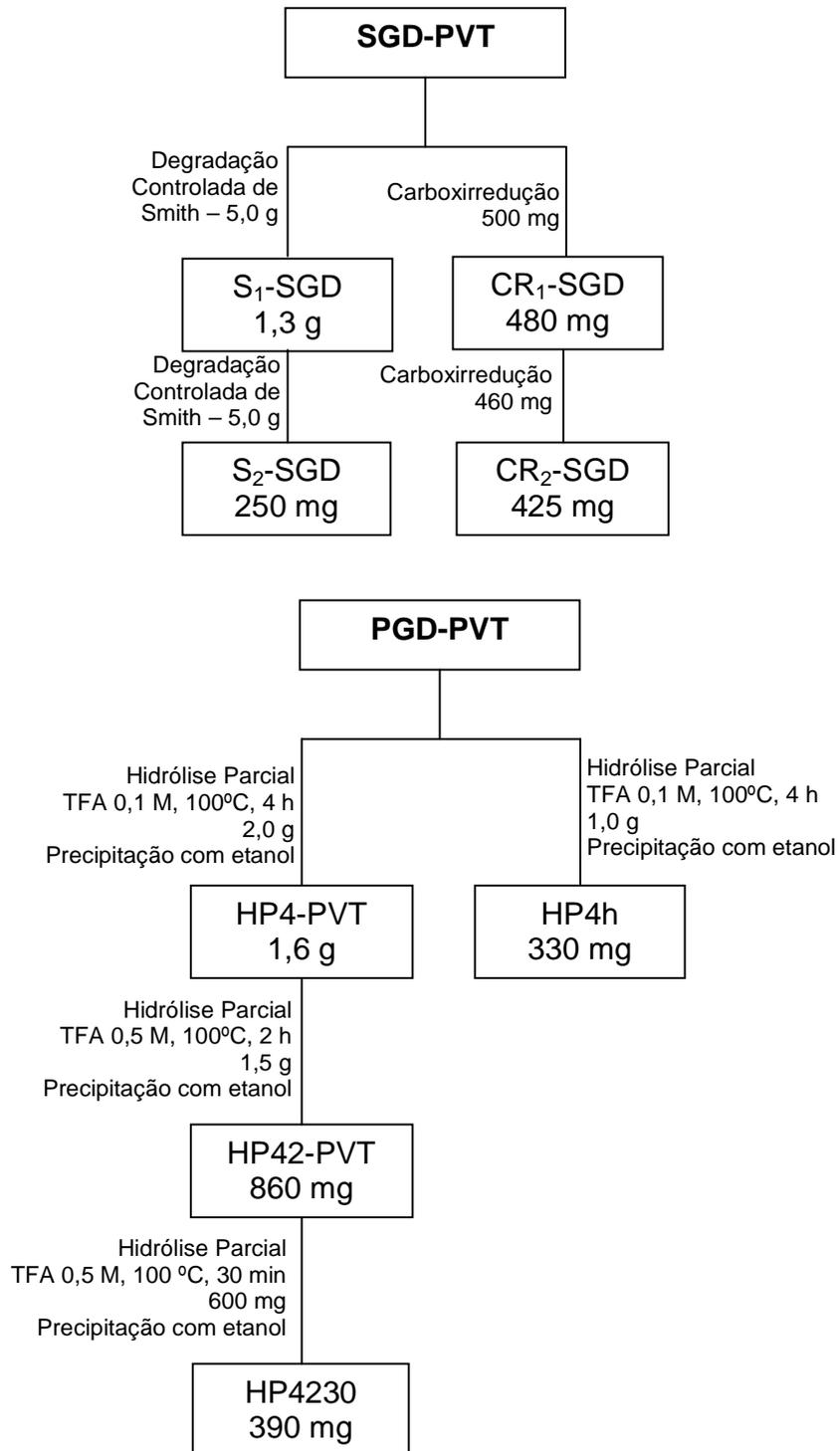


FIGURA 9: Fluxograma de obtenção das frações a partir do polissacarídeo da goma de *Vochysia tucanorum*

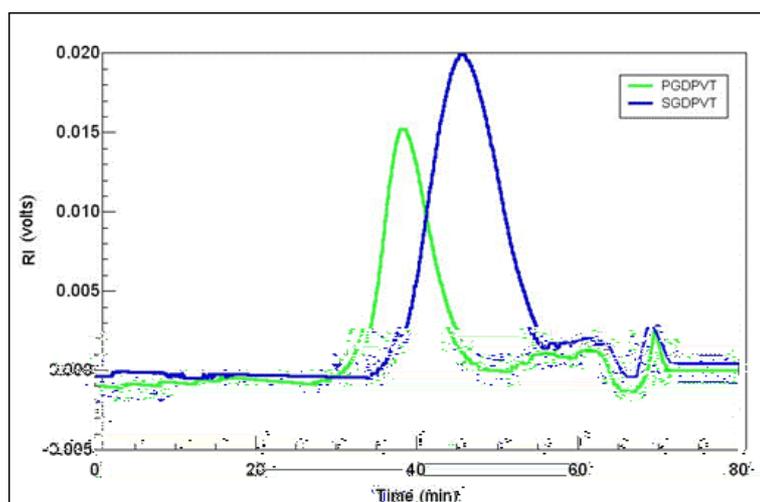


FIGURA 10: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS das frações SGD e PGD-PVT obtidas após processo de congelamento e degelo.

As frações purificadas, as frações foram submetidas à hidrólise total com TFA 1 M durante 8 h à 100 °C, para análise da composição monossacarídica. Todas as hidrólises foram acompanhadas por cromatografia em papel. Como é possível observar na TABELA 4, os monossacarídeos principais são arabinose, galactose e ácido urônico, e ainda pequenas quantidades de manose e glucose.

TABELA 4: Composição monossacarídica, em porcentagem, das frações obtidas da goma de *V. tucanorum*, após purificação por congelamento e degelo.

Monossacarídeos <sup>a</sup>	Frações (%)				
	SGD-PVT	PGD-PVT	SGD-PVTQ	PGD-PVTQ	SGD-PVTK
Arabinose	43	51	55	58	61
Xilose	1	1	1	-	-
Manose	5	5	3	3	2
Galactose	18	16	20	16	16
Glucose	2	2	2	2	1
Ácido urônico <sup>b</sup>	31	25	19	21	20

<sup>a</sup> Hidrólise com TFA 1 M, 100 °C durante 8 h. Monossacarídeos derivados à alditol acetato e analisados por GC-MS.

<sup>b</sup> O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991.

A composição monossacarídica das frações do sobrenadante e precipitado de congelamento e degelo apresentaram-se semelhantes, indicando, a princípio, que o procedimento de purificação por congelamento e degelo apenas foram separados polissacarídeos iguais com pesos moleculares diferentes. Esta indicação foi confirmada ao se realizar as análises de RMN-<sup>13</sup>C destas frações. A primeira fração analisada foi o polissacarídeo nativo (PVT), antes de realizar a purificação, e como se pode verificar na FIGURA 11, existem muitos sinais na região de C-1, dentre os quais podemos destacar os sinais na faixa de  $\delta$  108,7 a 106,1 referentes a unidades de  $\alpha$ -L-Araf (JOSELEAU et al., 1977), um sinal em  $\delta$  104,3 que pode ser atribuído às unidades de  $\beta$ -D-Galp 3-O substituídas (PERLIN e CASU, 1969), além do sinal em  $\delta$  101,2 correspondente às unidades de  $\beta$ -D-GlcpA 4-O substituídas (WAGNER et al., 2004). Ainda pôde ser verificado o sinal em  $\delta$  174,2 referente ao  $\text{C}=\text{O}$  do C-6 das unidades de ácidos urônicos.

Os espectros de RMN-<sup>13</sup>C das frações SGD-PVT e PGD-PVT foram analisados e verificou-se que os espectros eram muito semelhantes e não diferiam da fração que lhe deu origem (PVT). Com isso, comprovou-se que se tratava mesmo de um único polissacarídeo com pesos moleculares diferentes. Desta maneira as frações de sobrenadante e precipitado de congelamento e degelo da extração aquosa a frio e a quente foram reunidas e passaram a ser chamadas de SGD-PVT e PGD-PVT, respectivamente.

Com o objetivo de se chegar à cadeia principal do polissacarídeo, as frações SGD-PVT e PGD-PVT foram submetidas a um ciclo de degradação controlada de Smith, oxidação com periodato de sódio, gerando as frações S<sub>1</sub>-SGD e S<sub>1</sub>-PGD, que foram posteriormente hidrolisadas com TFA (1 M, 100 °C durante 8 h) e tiveram sua composição monossacarídica determinada. Os resultados encontrados estão mostrados na TABELA 5. Pode-se verificar que apenas um ciclo de oxidação foi suficiente para diminuir somente as unidades de arabinose das cadeias laterais, mas como se pode notar uma diminuição da quantidade de ácido urônico, podemos sugerir que estas unidades encontram-se O-4 ligadas e desta forma são passíveis de sofrerem oxidação pelo periodato de sódio.



Ao se analisar os espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  das frações  $\text{S}_1\text{-SGD}$  e  $\text{S}_1\text{-PGD}$  (FIGURA 12) pode-se verificar que os espectros sofreram uma modificação pela hidrólise parcial depois de serem oxidados, restando sinais referentes às unidades de  $\alpha\text{-L-Araf}$  ( $\delta$  109,0) e outros conjuntos de sinais em  $\delta$  103,5 e 101,5. Estes dois espectros são similares, mostrando que mesmo os polissacarídeos apresentando  $M_w$  diferentes eles possuem estruturas semelhantes, pois ao serem oxidadas mostram espectros parecidos. Porém, com a degradação controlada de Smith não foi possível esclarecer qual era a cadeia principal do polissacarídeo.

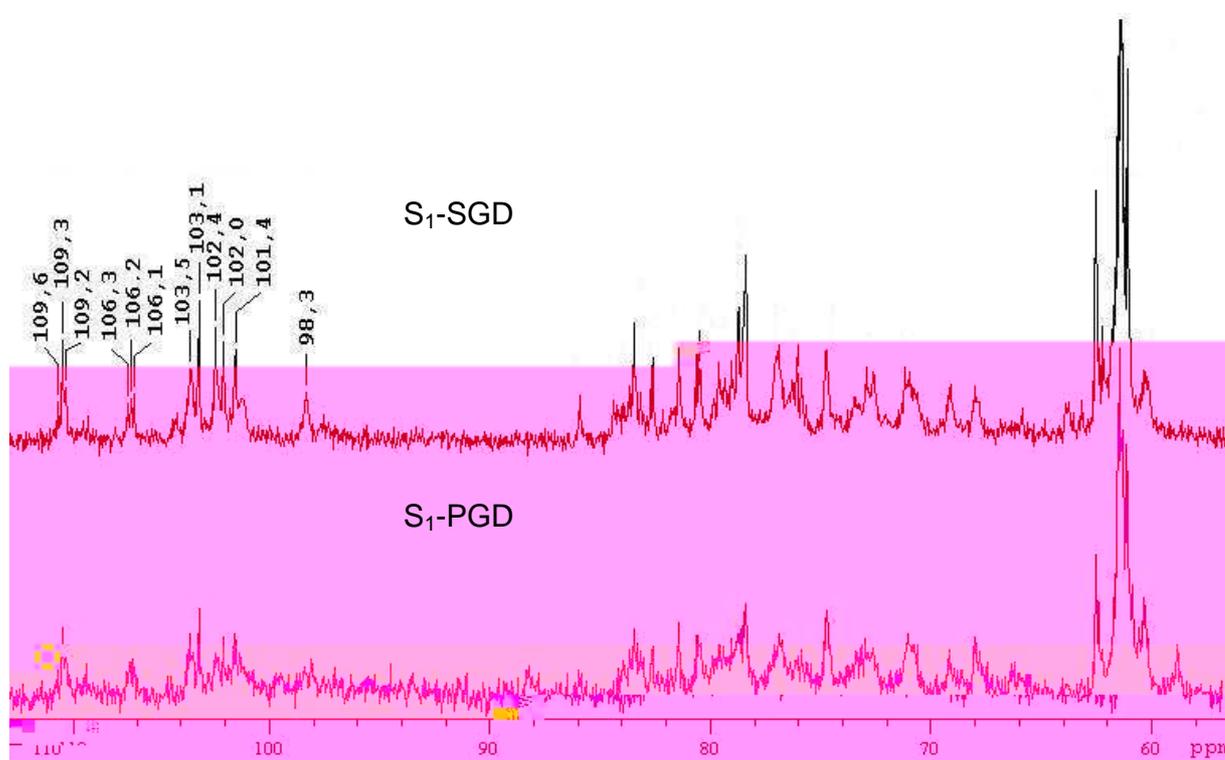


FIGURA 12: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  dos polissacarídeos obtidos após degradação controlada de Smith ( $\text{S}_1\text{-SGD}$  e  $\text{S}_1\text{-PGD}$ ). Análise realizada com “probe” de 5 mm, 50 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

A estratégia utilizada para se chegar a cadeia principal foi a hidrólise ácida parcial, que foi realizada como descrita em Material e Métodos, no item 3.6. O polissacarídeo gerado (HP4-PVT) na primeira hidrólise (TFA 0,1 M por 4 h a 100 °C) apresentou na composição monossacarídica uma diminuição dos teores de arabinose

(TABELA 6), mas esperava-se que este resultado fosse mais relevante, pois em uma concentração decimolar de ácido a 100 °C seria suficiente para remover todas as unidades de arabinose, e isso não ocorreu, possivelmente porque não ocorreu completa solubilização da amostra.

Então, uma nova hidrólise foi realizada com TFA 0,5 M por 2 h a 100 °C (HP42). Neste polissacarídeo parcialmente hidrolisado houve remoção, quase completa, das unidades de arabinose e um grande aumento nos teores de galactose, sugerindo que unidades de  $\beta$ -D-Galp 3-O substituídas pudessem estar presentes, o que pode ser notado pelo espectro de RMN-<sup>13</sup>C, onde o sinal em  $\delta$ 103,6 é característico deste polímero (TISCHER et al., 2002; GUTIÉRREZ de G et al., 2005; GORIN e MAZUREK, 1975).

TABELA 6: Composição monossacarídica das frações obtidas da goma de *V. tucanorum*, após hidrólise ácida parcial

Monossacarídeos <sup>a</sup>	Frações (%)				
	PGD-PVT	HP4-PVT	HP42-PVT	HP4230	HP4h
Arabinose	52	21	3	2	-
Manose	5	17	16	23	39
Galactose	16	31	62	45	4
Glucose	2	7	4	5	18
Ácido urônico <sup>b</sup>	25	24	15	6	39

<sup>a</sup> Hidrólise com TFA 1 M, 100 °C durante 8 h. Monossacarídeos derivados à alditol acetato e analisados por GC-MS.

<sup>b</sup> O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991.

PGD-PVT – polissacarídeo do precipitado de congelamento e degelo

HP4-PVT – hidrólise com TFA 0,1 M; 100 °C, 4 h

HP42-PVT – hidrólise com TFA 0,5 M; 100 °C, 2 h

HP4230 – hidrólise com TFA 0,5 M; 100 °C, 30 min

HP4h – hidrólise com TFA 0,5M; 100 °C, 4 h

Para tentar deixar a cadeia principal com menos substituintes uma nova hidrólise com TFA 0,5 M por 30 minutos a 100 °C foi realizada na fração HP42, gerando HP4230, e o resultado mostrou uma redução dos teores de galactose, ficando o polissacarídeo com arabinose, manose, galactose, glucose e ácido urônico na proporção molar de 2:23:45:5:26. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C desta fração (FIGURA 13A) mostrou um espectro

com 7 sinais bem resolvidos na região de C-1. Verifica-se que o sinal em  $\delta$  103,5 é referente as unidades de  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 3) ligadas, e outros dois sinais em  $\delta$ 101,6 e 98,3, que remeteram a uma estrutura já determinada para o polissacarídeo da goma de *V. lehmannii*, uma glucuronomanana (WAGNER et al., 2004).

Para verificar se esta estrutura realmente estava presente no polissacarídeo foi realizada uma hidrólise parcial com condições mais drásticas. Foi utilizado TFA 0,5 M a 100 °C durante 4 h para dar origem a fração HP4h. Através da composição monossacarídica já podemos verificar que foi removida grande parte das unidades de galactose, restando apenas 4% de galactose, ainda com a presença de manose (39%), glucose (18%) e ácido urônico (39%). A análise de RMN-<sup>13</sup>C de HP4h mostrou o que era esperado, um espectro com apenas dois sinais principais na região de carbono anomérico (FIGURA 13B). Sendo o sinal em  $\delta$  98,3 correspondente às unidades de  $\alpha$ -D-Manp substituídas em O-2 e o sinal em  $\delta$  101.5 correspondente às unidades de  $\beta$ -D-GlcpA substituídas em O-4 e de modo alternado e repetitivo, como já descrito para a goma de *V. lehmannii* (WAGNER et al., 2004) e o sinal em  $\delta$  92,1 é correspondente a extremidade redutora de  $\alpha$ -D-Manp.

A grande dificuldade aqui encontrada foi a porcentagem de glucose encontrada na composição monossacarídica (18%), pois não havia evidências desta no espectro de RMN. A princípio acreditava-se que este monossacarídeo estivesse presente, entretando esta glucose pode ser proveniente da `reduc2 11.6503 Tf 0.999435 3432125( )277.9`

fragmentação do glucitol temos a presença de íons provenientes da fragmentação primária que são característicos desta redução ( $m/z$  147, 219, 291 e 377).

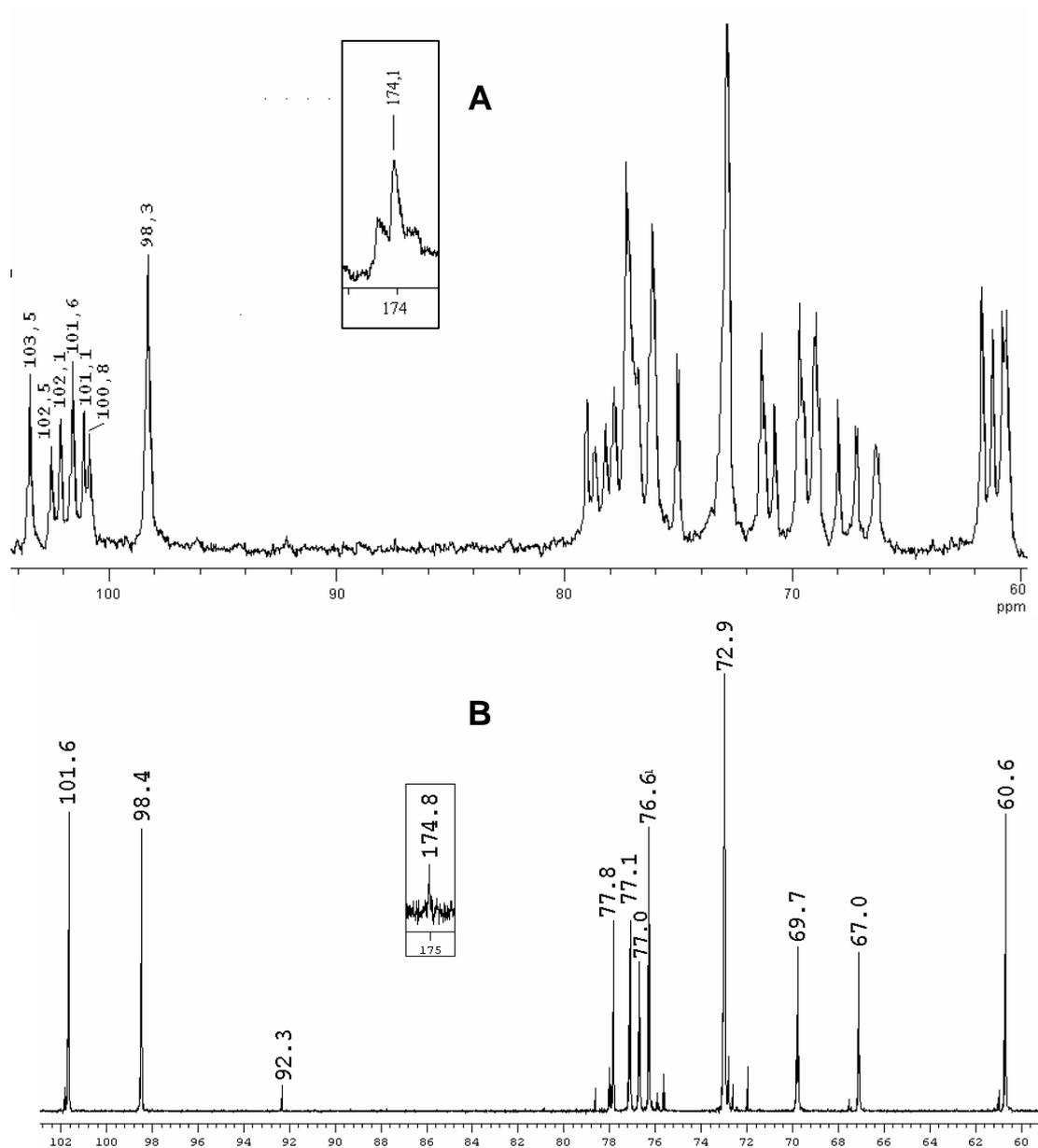


FIGURA 13: Espectro se RMN- $^{13}\text{C}$  das frações HP4230 (A) e HP4h (B), obtidas após hidrólise parcial. Análise realizada com “probe” de 5 mm, 50 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

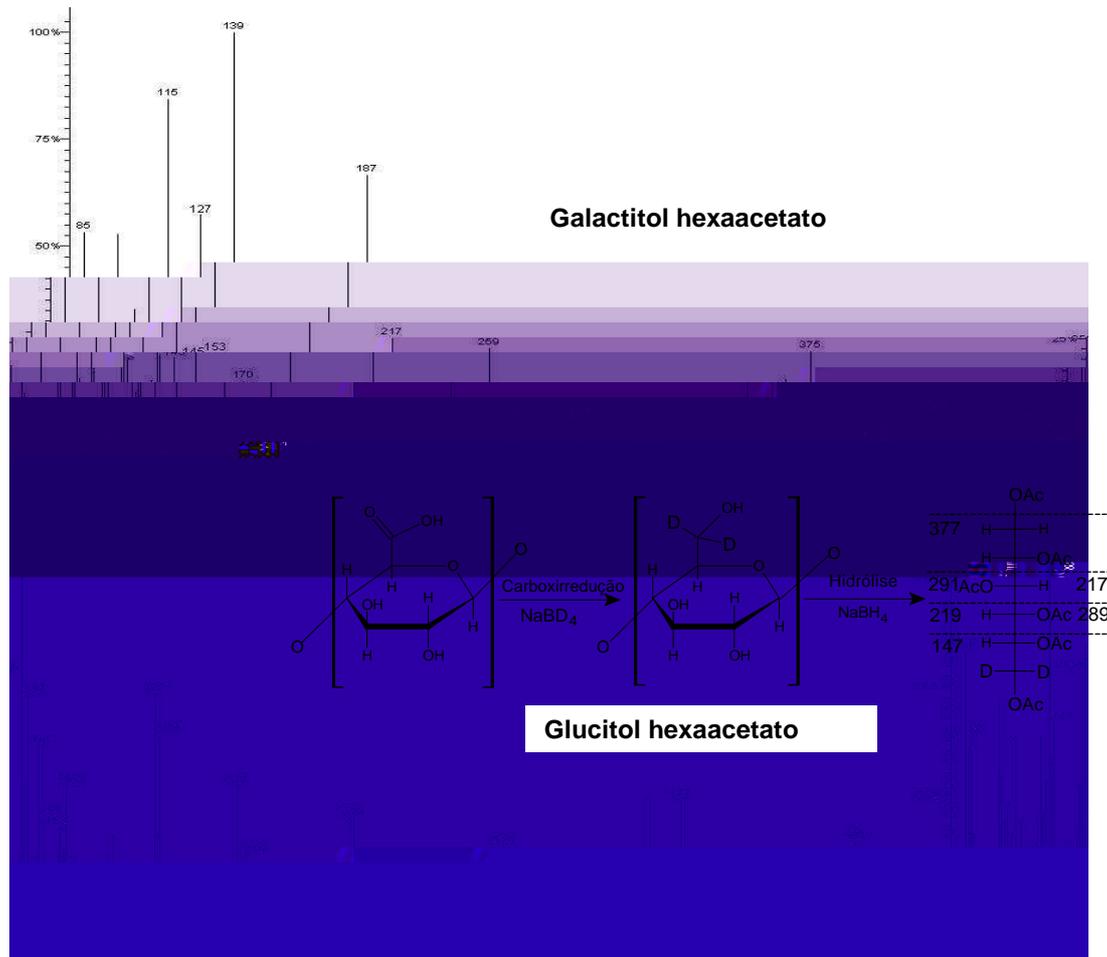


FIGURA 14: Perfil de fragmentação de massa em análise por GC-MS da amostra HP4h, reduzida com  $\text{NaBD}_4$ .

Outra forma de identificar a presença do ácido urônico presente foi através da técnica de carboxirredução (TAYLOR e CONRAD, 1972). Com a redução do ácido urônico presente, concomitantemente, irá ocorrer um aumento no correspondente açúcar neutro formado. Para o polissacarídeo da goma de *V. tucanorum* (SGD-PVT) foram necessários 2 ciclos de carboxirredução, mesmo assim restaram no polissacarídeo 4% de ácido urônico. Desta forma, o que anteriormente era de 31% de ácido urônico, passou agora a ter apenas 4%, quantidade esta que não iria interferir nos próximos experimentos.

A composição monossacarídica dos dois ciclos foi acompanhada para verificar se um aumento nas porcentagens de glucose era observado (TABELA 7), mas isso não foi possível, uma vez que a hidrólise do polissacarídeo carboxirreduzido ocorre com maior facilidade sem a interferência do grupos carboxílico dos ácidos urônicos, foi observado um aumento nas quantidades de glucose e de galactose. Somente com este resultado não seria possível definir qual é o ácido urônico em questão, mas com o resultado anterior pode-se afirmar com certeza que se trata do ácido glucurônico. Os espectros de RMN-<sup>13</sup>C destas frações não foram obtidos.

TABELA 7: Composição monossacarídica das frações carboxirreduzidas obtidas da fração SGP-PVT de *V. tucanorum*

Monossacarídeos <sup>a</sup>	Frações (%)		
	SGD-PVT	CR <sub>1</sub> -SGD	CR <sub>2</sub> -SGD
Arabinose	43	43	43
Xilose	1	1	1
Manose	5	11	13
Galactose	18	28	29
Glucose	2	8	10
Ácido Urônico <sup>b</sup>	31	9	4

<sup>a</sup> Hidrólise com TFA 1 M, 100 °C durante 8 h. Monossacarídeos derivados à alditol acetato e analisados por GC-MS.

<sup>b</sup> O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991.

Os dados obtidos de composição monossacarídica e RMN-<sup>13</sup>C foram confirmados pela análise dos dados de metilação. Todas as amostras de polissacarídeos foram primeiramente submetidas ao método de Haworth para facilitar a solubilização dos polissacarídeos em Me<sub>2</sub>SO e, posteriormente, metilados pelo método de CIUCANU e KEREK (1984).

Através da análise dos dados de metilação das frações originais, SGD-PVT e PGD-PVT (TABELA 8), pode-se mais uma vez confirmar o que já era indicado pelos dados de composição monossacarídica e RMN-<sup>13</sup>C. Estas duas frações são muito similares e diferem realmente no tamanho molecular. Elas são bastante ramificadas com elevada porcentagem de terminais não redutores de Araf (31%) e ainda é observado unidades de Araf que estão substituídas em O-2 ou O-3. Ainda estão presentes unidades de Ara que podem ser tanto piranosídicas quanto furanosídicas,

representadas pelo derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara (9% e 10%, respectivamente), além da presença de Ara f O-2,3-substituídas, o que sugere um alto grau de ramificação para estas moléculas. Não foram observados terminais não redutores de Man<sub>p</sub>, mas observou-se uma porcentagem de 5% de terminais não redutores de Gal<sub>p</sub>. Estes terminais podem estar como substituições simples da cadeia principal ou como terminais de cadeias laterais de (1→3)-Gal<sub>p</sub> ligadas, visto que estão presentes 16% e 17% do derivado 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal. A cadeia principal do polissacarídeo é indicada pela presença dos derivados 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (3%) e 4,6-Me<sub>2</sub>-Man (10%), onde as unidades de Man encontram-se O-2 ligadas e uma maior porcentagem encontra-se ligada em O-2 e substituída em O-3.

A degradação controlada de Smith (S<sub>1</sub>-SGD) mostrou uma redução nos teores de Ara (10%), que após este tratamento se encontram como terminais não redutores, e com concomitante aumento dos terminais não redutores de Gal (17%), indicando que as unidades de Ara podem ser substituintes nas cadeias de (1→3)-Gal<sub>p</sub> ligadas ou como substituições únicas nas unidades de Man<sub>p</sub>, confirmados pelo aumento nas porcentagens dos derivados 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (12%), 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal (33%) e 4,6-Me<sub>2</sub>-Man (24%), além de uma diminuição do derivado 2,6-Me<sub>2</sub>-Gal (4%). Estes dados estão de acordo com a técnica utilizada, uma vez que as unidades de Gal 3-O substituídas são resistentes à oxidação com o *m*-periodato de sódio e como uma grande porcentagem das unidades de Man são ligadas em O-2, mas são substituídas em O-3 também são resistentes à oxidação.

A fração carboxirreduzida (CR<sub>2</sub>-SGD) por ser proveniente da fração SGD-PVT deve se assemelhar em muito a ela, com o único diferencial que em CR<sub>2</sub> observa-se a presença do derivado 2,6-Me<sub>2</sub>-Glc (13%) que foi gerado a partir da redução das unidades de ácido glucurônico, formando glucose. A presença deste derivado indica que as unidades de ácido glucurônico encontram-se ligadas em O-4 e substituídas em O-3 por cadeias laterais de β-D-Gal<sub>p</sub> 3-O substituídas ou por terminais não redutores de Gal ou Ara.

As frações obtidas por hidrólise ácida parcial (HP4230 e HP4h) apresentaram poucos derivados metilados. A fração HP4230 mostrou um alto teor de terminais não redutores de Gal<sub>p</sub> (30%), indicando que estas unidades estão ligadas na cadeia

principal como terminais não redutores, ou ainda como terminais de cadeias laterais de  $\beta$ -D-Galp 3-O substituídas, representadas pelo derivado 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal (16%). Os derivados 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (19%) e 4,6-Me<sub>2</sub>-Man (31%) indicam que a cadeia principal encontra-se substituída em O-3 e que as unidades de Manp estão (1→2) ligadas.

Na análise dos dados da fração HP4h verifica-se que grande parte das cadeias laterais de Gal foram removidas, restando poucas unidades de Galp como terminais não redutores e que em sua maioria temos apenas unidades de  $\alpha$ -D-Manp 2-O substituídas.

TABELA 8: Análises de metilação das frações de *V. tucanorum*: alditóis acetatos neutros parcialmente O-metilados obtidos das frações per-O-metiladas.

Alditol acetato <sup>a</sup>	$R_t^c$	% de área do fragmento <sup>b</sup>					
		SGD-PVT	PGD-PVT	S <sub>1</sub> -PVT	CR <sub>2</sub>	HP4230	HP4h
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	0.81	31	31	10	24	2	-
3,5-Me <sub>2</sub> -Ara	0.93	3	2	-	1	-	-
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	0.96	5	8	-	6	-	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.99	-	-	-	-	2	4
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	1.03	9	10	-	2	-	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.05	5	-	17	3	30	3
5-Me-Ara	1.13	3	5	-	3	-	-
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.28	3	1	12	2	19	88
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.35	16	17	33	18	16	-
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.37	3	-	-	5	-	-
4,6-Me <sub>2</sub> -Man	1.63	10	17	24	18	31	5
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1.70	9	9	4	11	-	-
2,6-Me <sub>2</sub> -Glc	1.75	-	-	-	13	-	-
2-Me-Gal	2.60	-	-	-	1	-	-

<sup>a</sup> % relativa à área total do pico; valores < 1% não estão inclusos

<sup>b</sup> O-Metil alditol acetatos analisados por GC-MS.

<sup>c</sup> Tempo de retenção relativo ao do derivado 2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol acetato

#### 4.2 Oligossacarídeos da goma de *V. tucanorum*

A partir do sobrenadante etanólico obtido da extração aquosa foi realizada uma cromatografia analítica em papel para verificar a presença de oligossacarídeos nesta fração. Diferentemente da goma de *V. lehmannii* já estudada, foi observado a presença de oligossacarídeos livres redutores em seu sobrenadante etanólico. A partir desta constatação foi realizado o isolamento destes oligossacarídeos através de coluna de carvão/Celite. O material foi aplicado nesta coluna e eluído primeiramente com água para a remoção de monossacarídeos, que neste caso foi principalmente arabinose. Em seguida a coluna foi eluída com soluções de concentração crescente de etanol (5, 10, 20 e 50%). O material eluído desta etapa foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD, FIGURA 15).

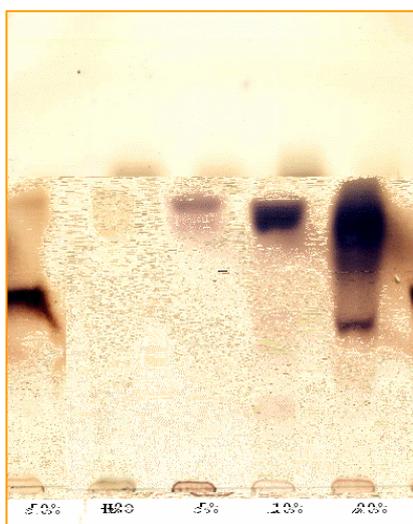


FIGURA 15: Cromatografia em camada delgada (CCD) das frações obtidas da coluna de carvão/celite. Fase móvel 4:2:2:1 (*n*-buOH:HOAc:EtOAc:H<sub>2</sub>O), corrida de 7 cm

A cromatografia em carvão/Celite foi útil no fato de ter separado os monossacarídeos, principalmente arabinose, dos oligossacarídeos, mas não foi eficiente para deixá-los com um grau de pureza necessário para serem analisados. Por este motivo, as frações de maior rendimento que continham oligossacarídeos (5, 10 e 20%) foram reunidas e aplicadas em uma coluna de gel permeação de Sephadex LH20.

Esta coluna foi eficiente em separar dois oligossacarídeos. O perfil de eluição destes oligossacarídeos é visualizado na FIGURA 16 e as frações que puderam ser analisadas foram denominadas de Oligo-2 e Oligo-4. As frações 1 e 3, apesar de conterem carboidratos, não foi possível interpretar os resultados.

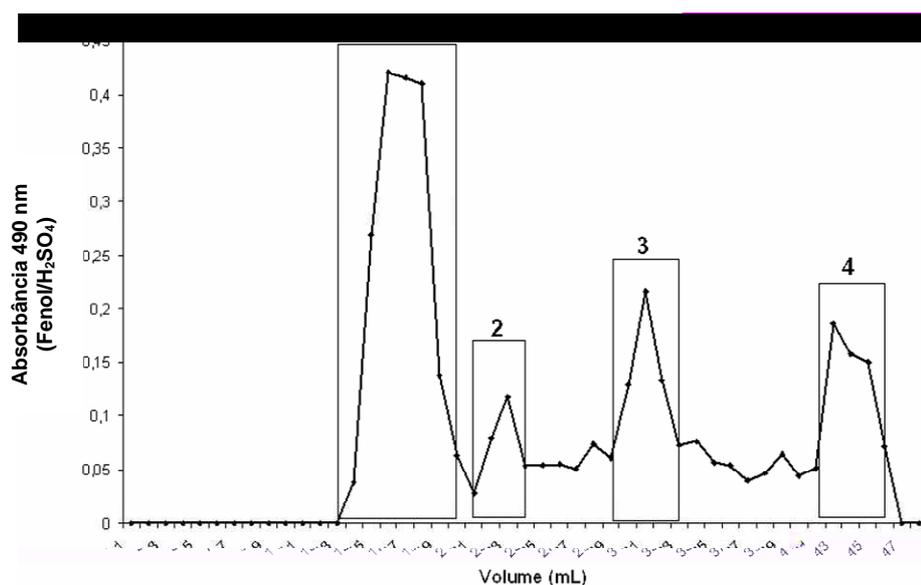


FIGURA 16: Perfil de eluição da cromatografia de gel permeação em Sephadex LH20 dos oligossacarídeos obtidos da coluna de carvão/Celite. Volume morto de 13 mL, volume total de 60 mL. Coluna eluída com água destilada.

O rendimento destas frações foi de 6 mg para o Oligo-2 e de 10 mg para o Oligo-4. Devido ao baixo rendimento as primeiras análises realizadas foram as de RMN-<sup>13</sup>C. A fração Oligo-2 mostrou um espectro de RMN-<sup>13</sup>C com apenas 5 sinais, sendo apenas 1 sinal na região de carbono anomérico (FIGURA 17A), sugerindo que não se tratava de um oligossacarídeo, mas de um polissacarídeo solúvel em etanol. O sinal em  $\delta$  103.1 do espectro de RMN-<sup>13</sup>C e o sinal centrado em  $\delta$  5,07 sugeriram que se tratava de uma  $\beta$ -D-xilana 4-O substituída (EBRINGEROVÁ et al., 1990) e com os espectros bidimensionais isso foi esclarecido.

Com os espectros de HMQC e COSY (FIGURA 17B e C) foi possível fazer os assinalamentos para todos os carbonos e prótons das unidades de xilose. Estes assinalamentos podem ser visualizados na TABELA 9. O espectro de TOCSY confirmou a presença da xilana, sem antes ter a composição monossacarídica e os dados de metilação (FIGURA 17D), onde foi possível ver todas as correlações entre H-1 e os demais prótons, sendo referentes aos prótons axiais da xilose.

TABELA 9: Deslocamentos químicos para carbono e próton obtidos para o Oligo-2.

$\beta$ -Xil-(1 $\rightarrow$ 4)	Posição				
	1	2	3	4	5
Carbono *	103,1	74,1	75,1	77,8	64,4
Próton *	5,05	3,88	4,15	4,35	3,97

\* Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

Após realizar as análises de RMN foram feitas as análises de composição monossacarídica e metilação. Na composição monossacarídica, como esperado, somente xilose foi observada. Os dados de metilação indicaram a presença de uma  $\beta$ -D-xilana 4-O substituída pela presença majoritária do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Xil, deuteroado em C-1.

A análise de ESI-MS foi feita para tentar determinar o tamanho molecular deste oligossacarídeo, mas não foi possível, pois por se tratar de uma molécula com apenas 5 sinais no espectro de RMN-<sup>13</sup>C e ter apenas um sinal na região de carbono anomérico já se suspeitava que este oligossacarídeo seria maior devido ao não aparecimento do terminal redutor.

Pelos dados de metilação foi possível estabelecer uma relação entre as áreas dos picos do terminal não redutor para a área do pico do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Xil e esta relação ficou na razão de 1:34, indicando que tratava-se realmente de um polissacarídeo solúvel em etanol e não de um oligossacarídeo.

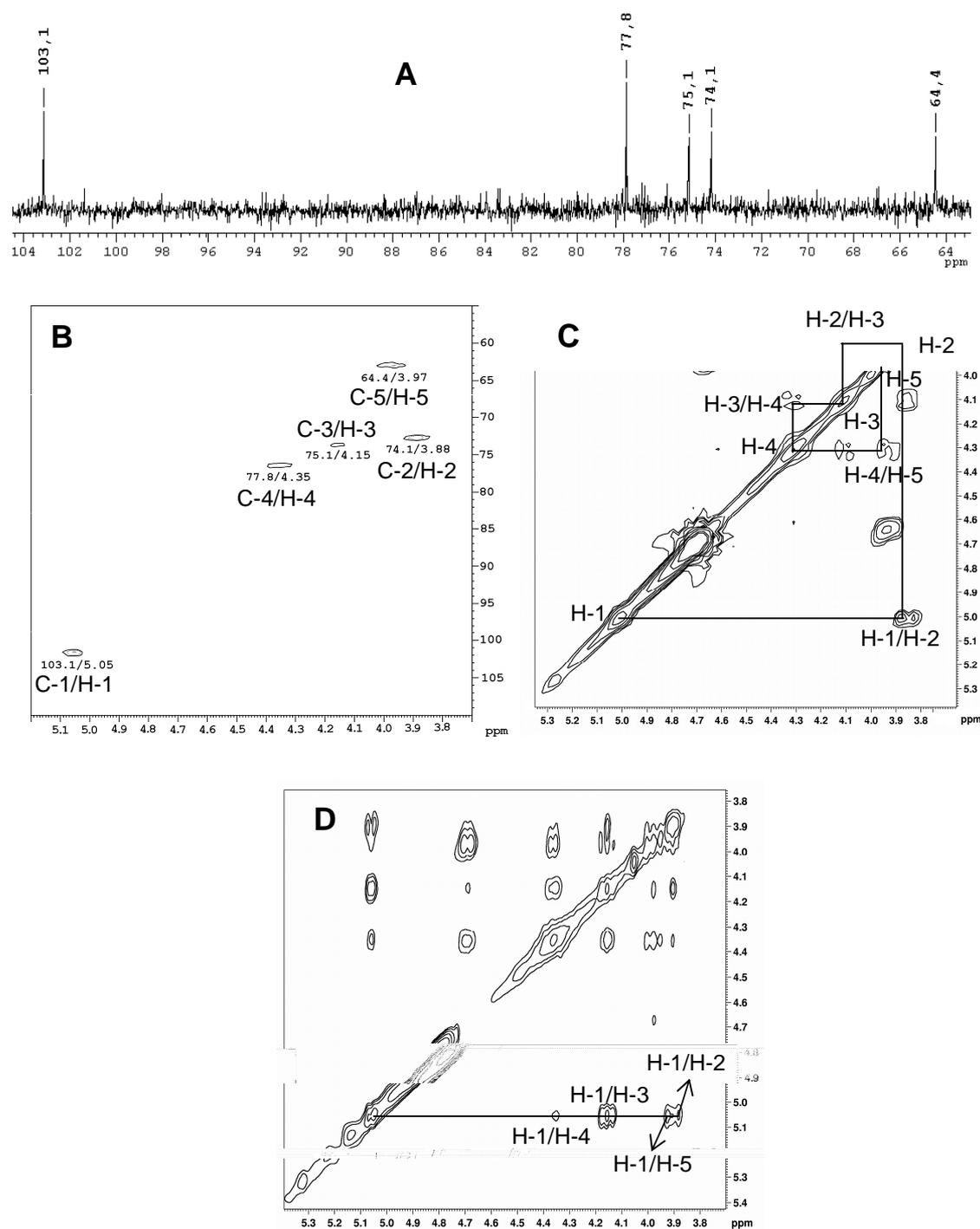


FIGURA 17: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (A), HMQC (B), COSY (C) e TOCSY (D) obtidos para o Oligo-2. Análise realizada com “probe” de 5 mm, 70 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

A fração Oligo-4 mostrou um espectro de RMN-<sup>13</sup>C bem mais complexo, com 6 sinais na região de carbono anomérico (FIGURA 18). A composição monossacarídica e os dados de metilação foram de extrema importância para a caracterização parcial da estrutura deste oligossacarídeo. A composição monossacarídica foi Ara:Man:Gal na razão molar de 5:3:2 e a análise de metilação mostrou a presença de terminais não redutores de Ara (21%), 2-O- (12%) e 3-O-Araf (10%) substituídas, 3-O- (8%) e 3,4-di-O-substituída Gal<sub>p</sub> (12%) e unidades 2-O-substituída de Man<sub>p</sub> (37%), entretanto estes dados não foram suficientes para estabelecer a estrutura deste oligossacarídeo.

Através da análise de ESI-MS (FIGURA 19A) foi possível desvendar a estrutura e verificar que este oligossacarídeo tratava-se de uma mistura de três oligossacarídeos que diferiam entre si apenas em uma unidade de arabinose ou de hexose. O íon molecular deste oligossacarídeo presente em maior porcentagem é o de  $m/z$  893 (Ara<sub>4</sub>Hex<sub>2</sub>) e depois os íons  $m/z$  1025 e 731 (Ara<sub>5</sub>Hex<sub>2</sub> e Ara<sub>4</sub>Hex, respectivamente) e ainda pode ser visualizado um íon com menor intensidade com  $m/z$  1156, que seria correspondente a Ara<sub>6</sub>

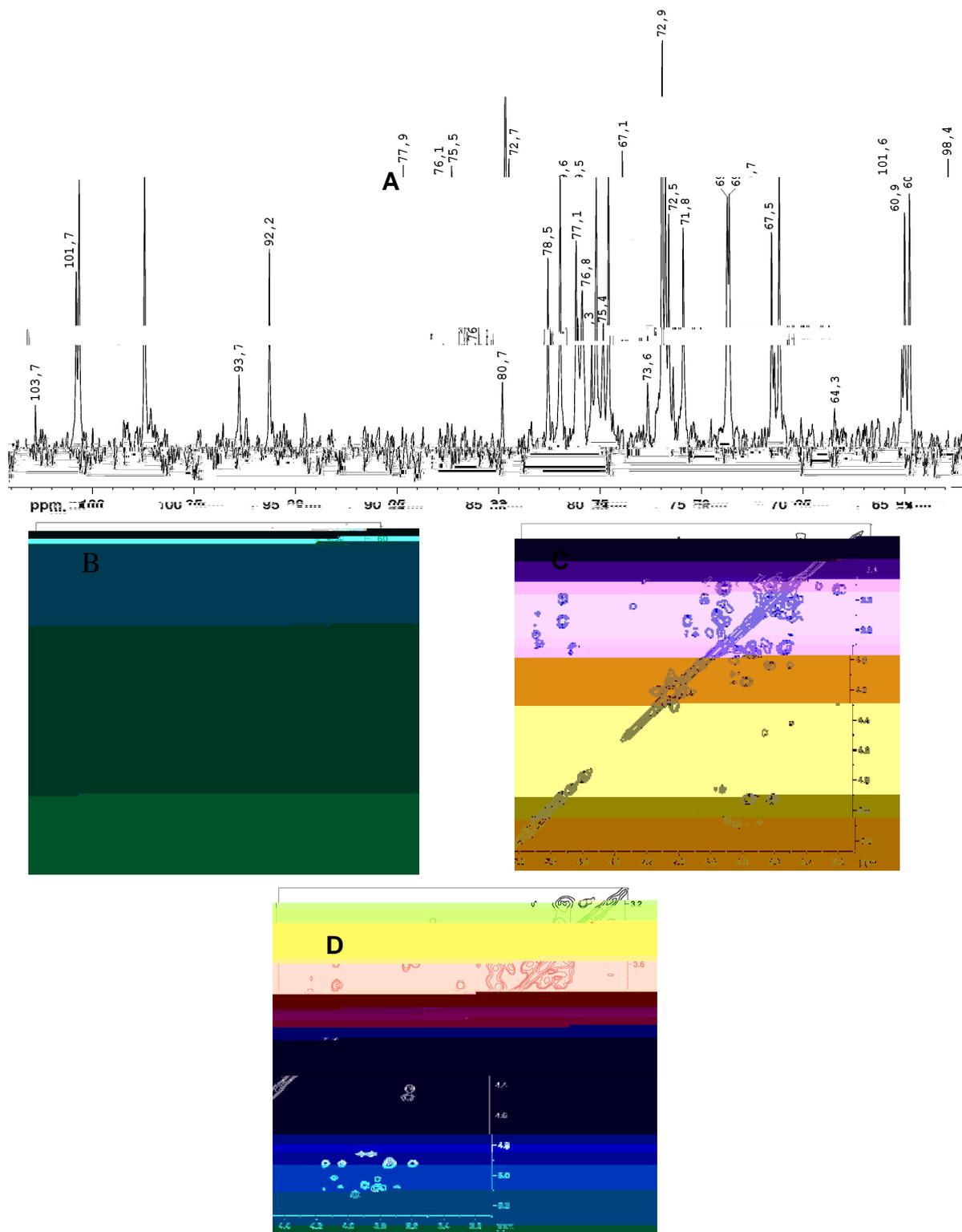
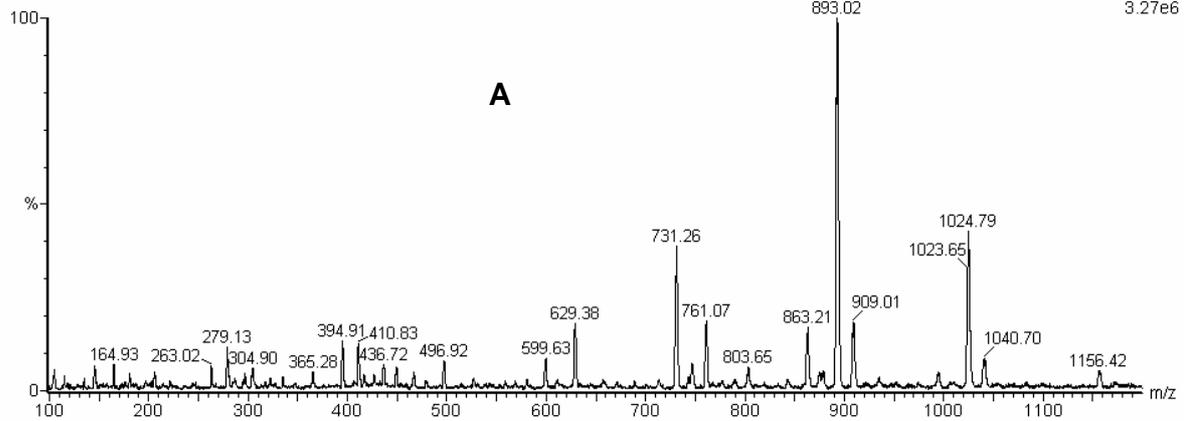


FIGURA 18: Espetros de RMN- $^{13}\text{C}$  (A), HMQC (B), COSY (C) e TOCSY (D) obtidos para o Oligo-4. Análise realizada com “probe” de 5 mm, 70 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

## RICW-4VT ESI+

RICW-4VT-A 15 (0.800) Sm (Mn, 3x0.70); Cm (3:39)

Scan ES+  
3.27e6

## RICW-4VT ESI+ MS/MS 893 - 80eV CID

RICW-4VT-C 54 (2.007) Sm (Mn, 3x0.70); Cm (4:54)

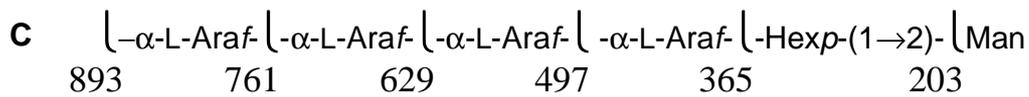
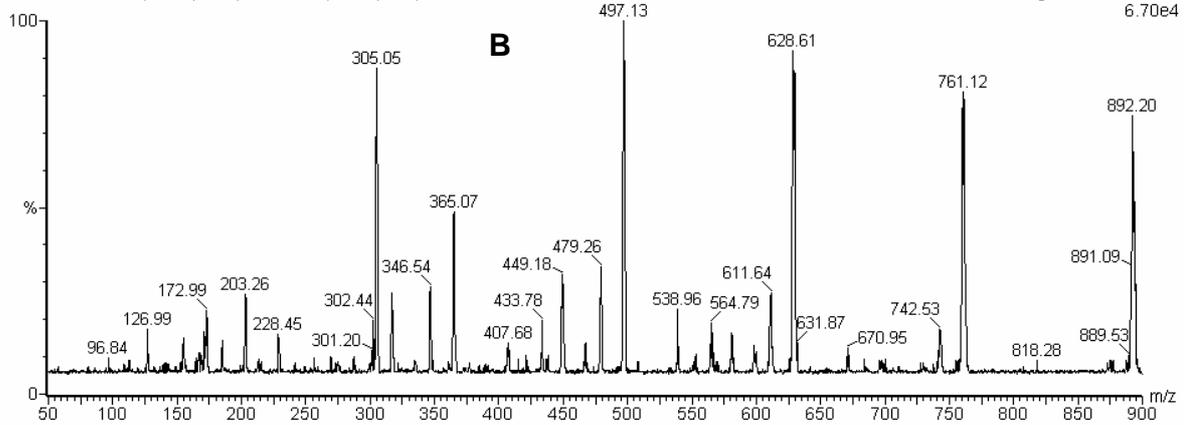
Daughters of 893ES+  
6.70e4

FIGURA 19: Espectro de ESI-MS para o Oligo-4. Scan realizado no modo positivo (A) e fragmentação do íon molecular com relação  $m/z$  893 (B). Em C tem-se a estrutura proposta para este oligossacarídeo.

#### 4.3 Polissacarídeo da goma de *V. thyrsoidea*

A goma de *V. thyrsoidea* (FIGURA 20) é de exsudação natural e a área de coleta, segundo informou a pesquisadora, é pertencente a uma região de queimadas frequentes, onde as árvores locais sofrem um estresse periódico, ou pela seca ou pela queimada. Foi enviada uma quantidade de 200 g de goma.

O processo de extração do polissacarídeo da goma foi semelhante ao da goma de *V. tucanorum*, mas com a diferença que não foi necessário fazer a solubilização desta goma em solução alcalina, uma vez que toda a goma foi solúvel em água à temperatura ambiente. O esquema de obtenção das frações até agora estudadas está representado na FIGURA 21.

A análise de homogeneidade por HPSEC (FIGURA 22) mostrou que este polissacarídeo (VTy) é homogêneo não necessitando, desta maneira, passar por nenhum processo de purificação. Mas, mesmo assim, este polissacarídeo passou por um tratamento com solução de Cetavlon 5%. Todo o polissacarídeo precipitou em pH 7,0, não restando polissacarídeo no sobrenadante após centrifugação. Quando este polissacarídeo foi novamente analisado para sua homogeneidade o perfil de eluição permaneceu idêntico, comprovando desta maneira a presença de apenas um polissacarídeo. A massa molecular ( $M_w$ ) foi determinada e apresentou um valor de 92.500 g/mol ( $dn/dc = 0,212$ ), com pequeno grau de polidispersão, indicado pela largura do pico obtido.



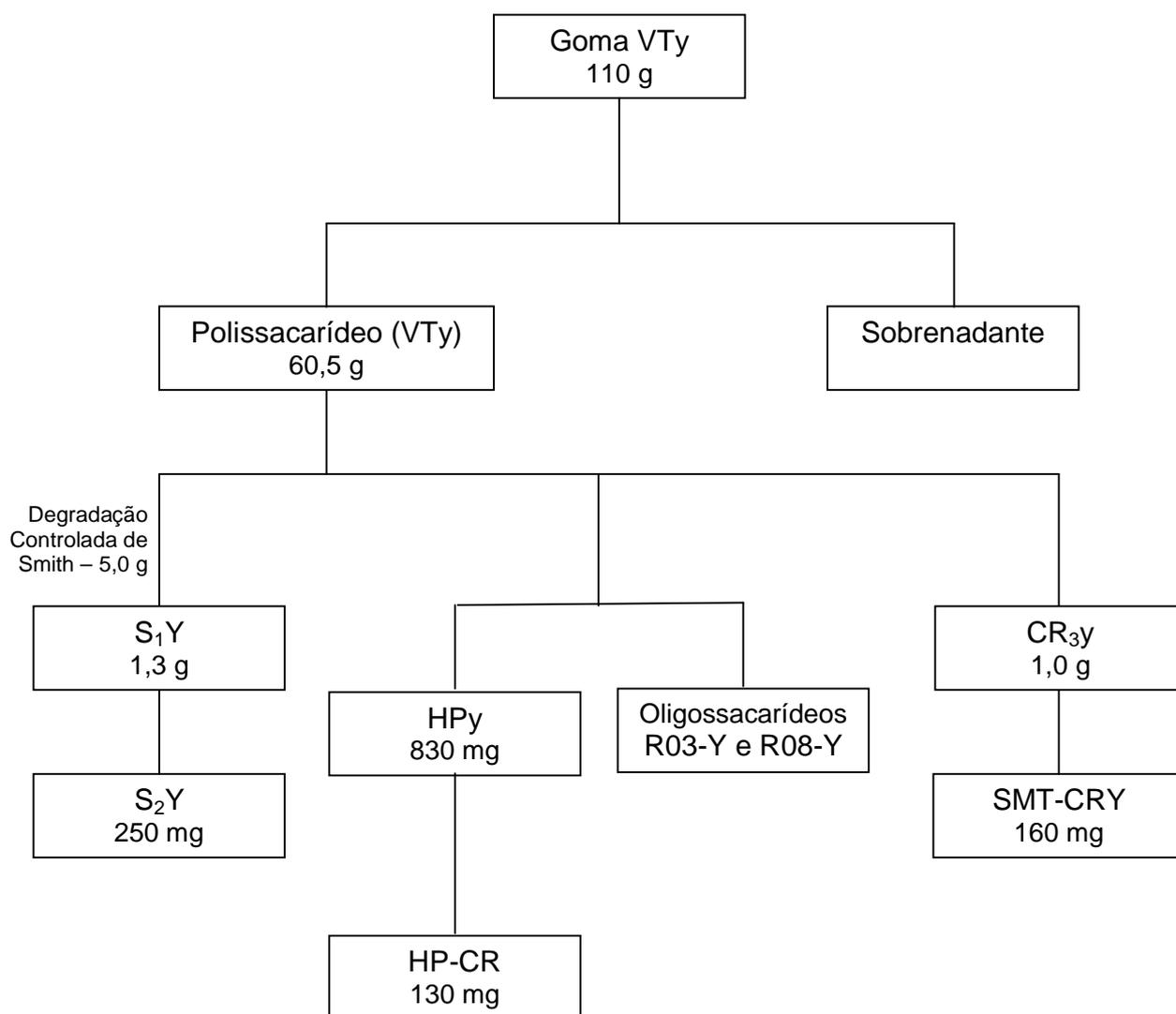


FIGURA 21: Fluxograma de obtenção das frações de polissacarídeo e oligossacarídeos da goma de exsudato de *V. thyrsoidea*.

A composição monossacarídica foi determinada após hidrólise com TFA 1 M por 8 h a 100 °C, e a quantidade de ácidos urônicos determinada pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991), resultando para este polissacarídeo na composição monossacarídica de Ara:Xil:Man:Gal:Glc e ácido urônico com proporção de 27:3:22:12:12:24, como mostrado na TABELA 10. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C (FIGURA 23) de VTy mostra um polissacarídeo complexo com vários sinais na região de carbono anomérico. Alguns sinais que podem ser destacados são os sinais na região de  $\delta$  108,0 a 106,3 que são correspondentes às unidades de  $\alpha$ -L-Araf. Ainda pode ser visto um

sinal em  $\delta$  104,3 correspondendo às unidades de  $\beta$ -D-Galp 3-O substituídas e um sinal mais intenso em  $\delta$  102,6 que pode ser correspondente a (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Galp com substituição em O-2 e o sinal em  $\delta$  98,5 foi atribuído ao C-1 das unidades de  $\alpha$ -D-Manp 2-O substituída.

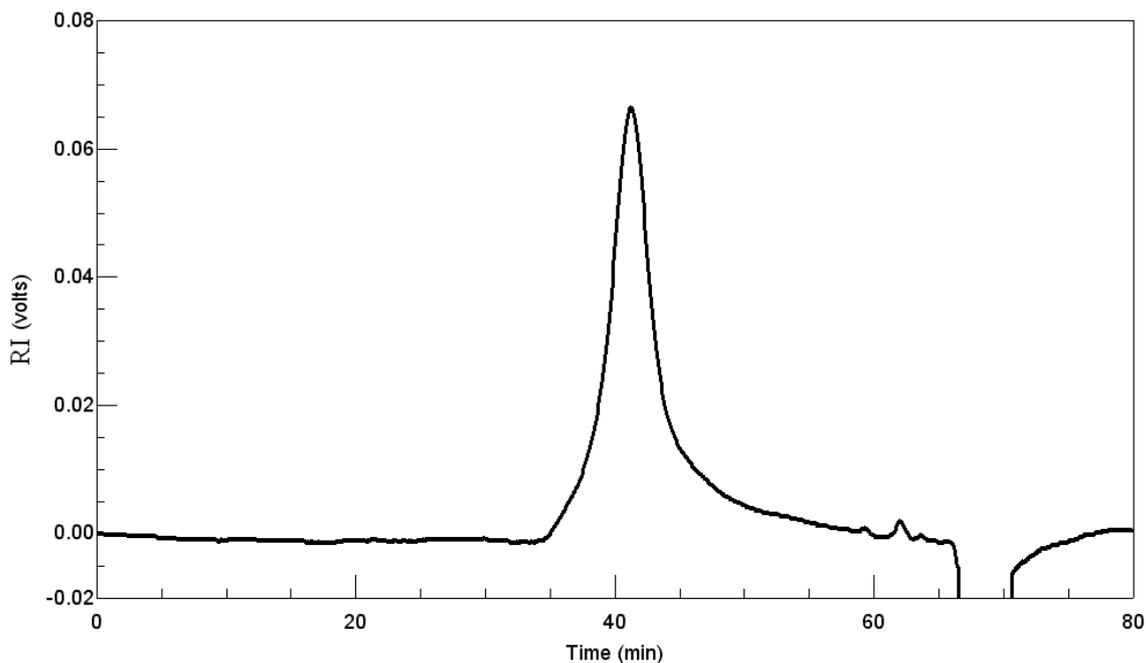


FIGURA 22: Perfil de eluição por HPSEC da fração VTY de *V. thyrsoides*, utilizando detector de índice de refração (RI).

Após a determinação da composição monossacarídica e esta análise prévia do espectro de RMN, deu-se início à degradação controlada de Smith para simplificar e facilitar a análise estrutural deste polímero. Foram realizadas duas degradações controladas em seqüência, que geraram as frações S<sub>1</sub>Y e S<sub>2</sub>Y. Os espectros de RMN das duas frações não mostraram sinais de boa qualidade, mesmo em diferentes solventes como D<sub>2</sub>O e Me<sub>2</sub>SO e tendo uma quantidade suficiente de amostra. Mas pela composição monossacarídica podemos verificar que as proporções de manose e ácido urônico permanecem aparentemente inalteradas, ocorrendo apenas uma diminuição

das porcentagens de Ara. Este resultado foi repetido novamente em outras degradações controladas de Smith realizadas, indicando que nesta estrutura estão presentes unidades que são mais resistentes à oxidação pelo *m*-periodato de sódio

TABELA 10: Composição monossacarídica das frações obtidas do polissacarídeo da goma de *V. thyrsoidea*.

Frações	Monossacarídeos (%) <sup>a</sup>					
	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	Ácido urônico <sup>b</sup>
VTy	27	3	22	12	12	24
S <sub>1</sub> Y	22	1	23	26	5	23
S <sub>2</sub> Y	16	1	30	20	12	21
HPy	2	-	35	3	21	39
HPy-CR	-	-	51	5	44	-
CR <sub>3</sub> y	28	4	29	10	25	4
SMT-CR	5	-	47	9	34	5

<sup>a</sup> Hidrólise com TFA 1 M, 100 °C durante 8 h. Monossacarídeos derivados à alditol acetato e analisados por GC-MS.

<sup>b</sup> O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991.

Como as degradações de Smith apenas retiraram unidades passíveis de oxidação e não expuseram a cadeia principal do polissacarídeo, foi realizada uma hidrólise parcial na fração VTy nas mesmas condições que foi realizada a hidrólise parcial para o goma de *V. tucanorum*, usando TFA 0,5 M à 100 °C durante 4 h. O polissacarídeo resultante (HPy) apresentou principalmente manose, glucose e ácido urônico. Novamente a presença de glucose não estava condizente com o espectro de RMN-<sup>13</sup>C (FIGURA 24) que apresentou apenas 2 sinais principais na região de carbono anomérico, correspondendo a um grupo de duas unidades repetitivas.

Para mostrar novamente que esta quantidade de glucose era proveniente da redução das unidades de ácido urônico, que em condições ácidas formam glucuronolactona, usou-se uma estratégia diferente daquela utilizada para o polissacarídeo de *V. tucanorum*. Desta vez, foi realizada uma condição na qual era possível quebrar a ligação da glucuronolactona antes de realizar a redução com NaBH<sub>4</sub>.

Após ser hidrolisado, o material foi levado à secura para a remoção do TFA e, na seqüência, utilizou-se uma quantidade catalítica de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para quebrar a ligação da glucuronolactona (Sasaki, 2006). Em seguida fez-se a redução com  $\text{NaBH}_4$  e depois a acetilação com piridina:anidrido acético. O resultado foi avaliado de duas formas, por GLC e por CCD. Analisando primeiramente a CCD (FIGURA 25) vemos que ao se adicionar  $\text{NH}_4\text{OH}$  ao hidrolisado ocorre a quebra da glucuronolactona e não se observa mais a banda referente a este composto. Já no hidrolisado onde não foi colocado  $\text{NH}_4\text{OH}$  a banda da glucuronolactona permanece. Então quando é realizada a redução com  $\text{NaBH}_4$  somente no material em que não foi desfeita a glucuronolactona é observada a presença de glucose. Ainda nesta figura pode-se notar que o material carboxirreduzido ( $\text{CR}_{3y}$ ) não apresenta a banda da glucuronolactona nem a banda de ácido urônico, mostrando, desta forma, que houve uma completa redução dos grupos carboxila.

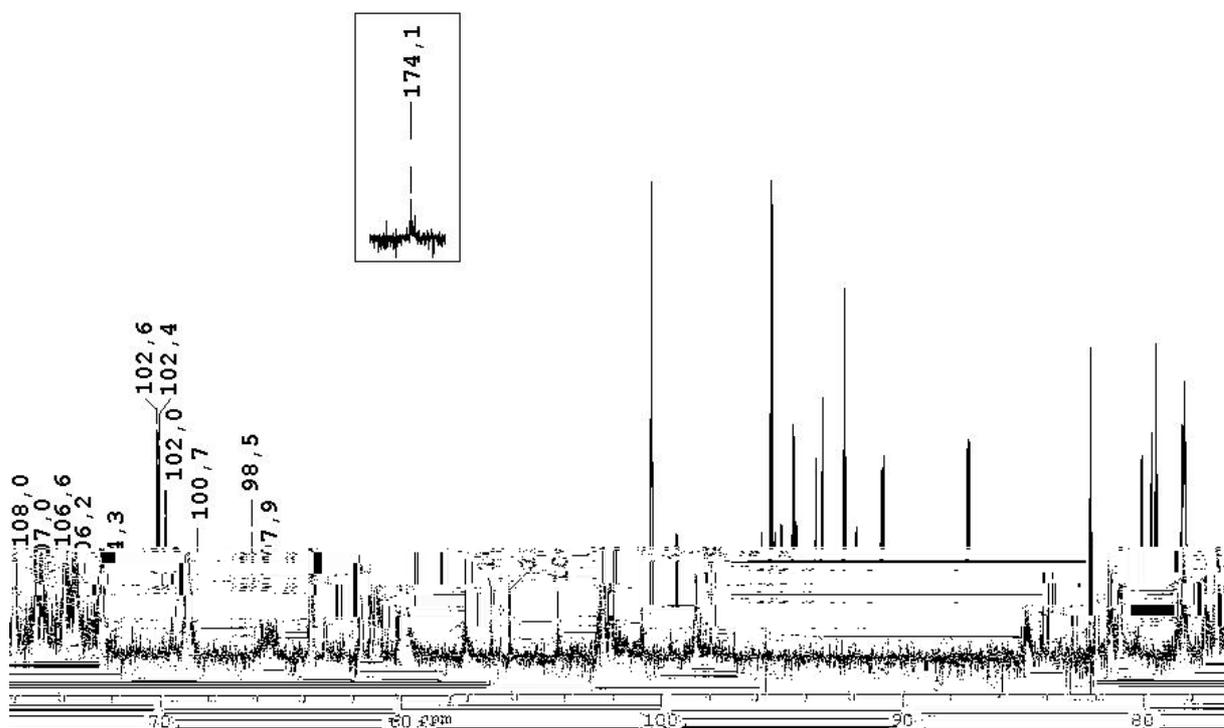


FIGURA 23: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo obtido da goma de *V. thyrsoidea* (VTy). Análise realizada com “probe” de 5 mm, 50 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

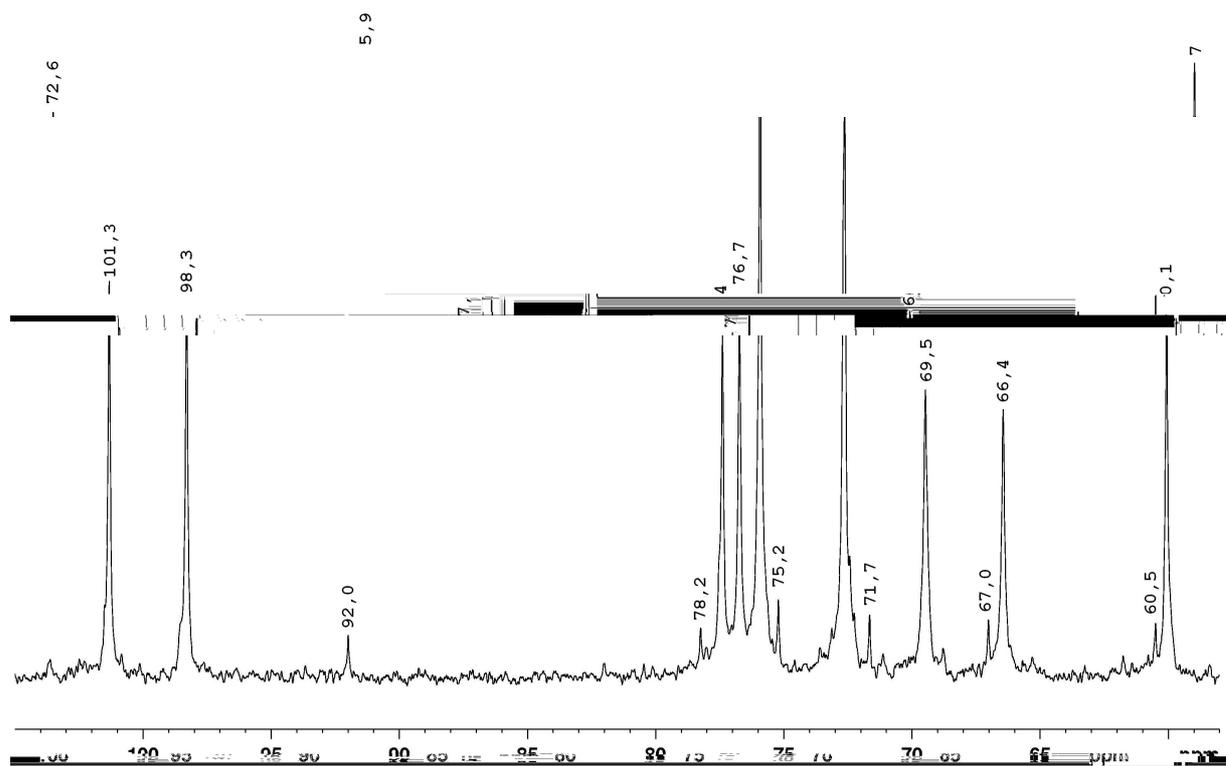


FIGURA 24: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração HPy, obtida após a hidrólise parcial de VTy. Análise realizada com “probe” de 5 mm, 50 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

Ao se analisar as amostras por GLC verificou-se que as proporções dos monossacarídeos para o material não tratado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  foi de Man (38%), Gal (7%), Glc (16%) e GlcA (39%). Quando o hidrolisado é tratado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  a composição monossacarídica é de Man (51%), Gal (8%), Glc (2%) e GlcA (39%). Estes resultados indicam que durante a hidrólise de material que contenha ácido urônico realmente ocorre a formação da glucuronolactona e a presença de glucose no material deve ser investigada com mais profundidade.

Quando este fração (HPy) foi carboxirreduzida, originando (HPy-CR), verificou-se que a composição monossacarídica permaneceu praticamente idêntica à composição da fração que lhe deu origem e que a dosagem de ácido urônico é uma metodologia, que apesar de ser colorimétrica, é confiável, pois antes da carboxirredução o conteúdo de ácido urônico era estimado em 39% e após a carboxirredução não houve desenvolvimento de coloração na dosagem e o conteúdo de glucose no material

carboxirreduzido foi de 38%. Este dado de composição monossacarídica está de acordo com o espectro de RMN-<sup>13</sup>C, onde pode-se notar que houve um deslocamento dos sinais correspondentes às unidades de  $\beta$ -D-GlcpA e  $\alpha$ -D-Man, que anteriormente no espectro de HPy (FIGURA 26A) eram  $\delta$  101,6 e 98,3, respectivamente. Após a carboxirredução estes sinais estão em  $\delta$  102,1 e 99,6 (FIGURA 26B), correspondendo às unidades de  $\beta$ -D-Glcp 4-O ligadas e  $\alpha$ -D-Manp 2-O ligadas, respectivamente.



FIGURA 25: Cromatografia em camada delgada (CCD) das frações HPy (tratada e não tratada com  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) e  $\text{CR}_{3y}$  hidrolisadas com TFA 1 M por 8 h a 100 °C. Padrões de glucuronolactona, ácido glucurônico, manose e glucose. Fase móvel 4:2:21 (1-proOH:EtOAc:HOAc:H<sub>2</sub>O), revelada com orcinol.

Partindo-se do princípio que em polissacarídeos que não apresentam grupamentos ácidos a hidrólise ocorre sem a interferência dos mesmos, uma outra idéia foi realizar uma degradação controlada de Smith no material carboxirreduzido. Para tanto, foi necessário realizar a carboxirredução de uma grande quantidade do polissacarídeo VTy, para dar origem à  $\text{CR}_{3y}$ . Após o primeiro ciclo de carboxirredução a

quantidade de ácido urônico era de 9%, depois do segundo ciclo de 5% e após o terceiro ciclo ainda restavam no polissacarídeo 4% de ácido urônico. Esta quantidade residual de ácido urônico, além de mostrar-se resistente ao método de carboxirredução, não teria uma influência tão grande quanto os 39% originais, por esse motivo fez-se um ciclo de degradação controlada de Smith nesta fração (CR<sub>3y</sub>). E podemos verificar que a composição monossacarídica (TABELA 10) da fração CR<sub>3y</sub> equivale à fração VTy, com redução das unidades de ácido urônico para o seu açúcar neutro correspondente, a glucose. Além deste fato, podemos verificar que no espectro de RMN-<sup>13</sup>C para a fração CR<sub>3y</sub> houve um deslocamento nos picos referentes a  $\beta$ -D-Glc $\rho$ A e a  $\alpha$ -D-Man $\rho$  (FIGURA 27A) e que após a degradação de Smith o espectro de RMN fica bem mais simples com apenas 2 sinais principais na região de C-1 (FIGURA 27B), pois ao ser realizada a degradação controlada de Smith ocorreu uma redução nos teores de arabinose (5%), permanecendo inalterado o valor de galactose (9%) e ocorreu um aumento nos valores de manose (47%) e glucose (34%).

Os resultados das análises de metilação mostrou melhor o que está ocorrendo em cada processamento feito com as amostras (TABELA 11). O polissacarídeo VTy apresenta uma grande quantidade de terminais não redutores de Araf (23%), além de uma pequena proporção de terminais não redutores de Arap (3%) e Xil $\rho$  (3%). Ainda podem ser observadas unidades de Gal $\rho$  como terminais não redutores (8%). Cadeias de (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal $\rho$  ligadas podem ser evidenciadas pela presença dos derivados 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal (4%), 2,6-Me<sub>2</sub>-Gal (10%) e 2-Me-Gal (3%), indicando uma ou duas substituições nesta cadeia.

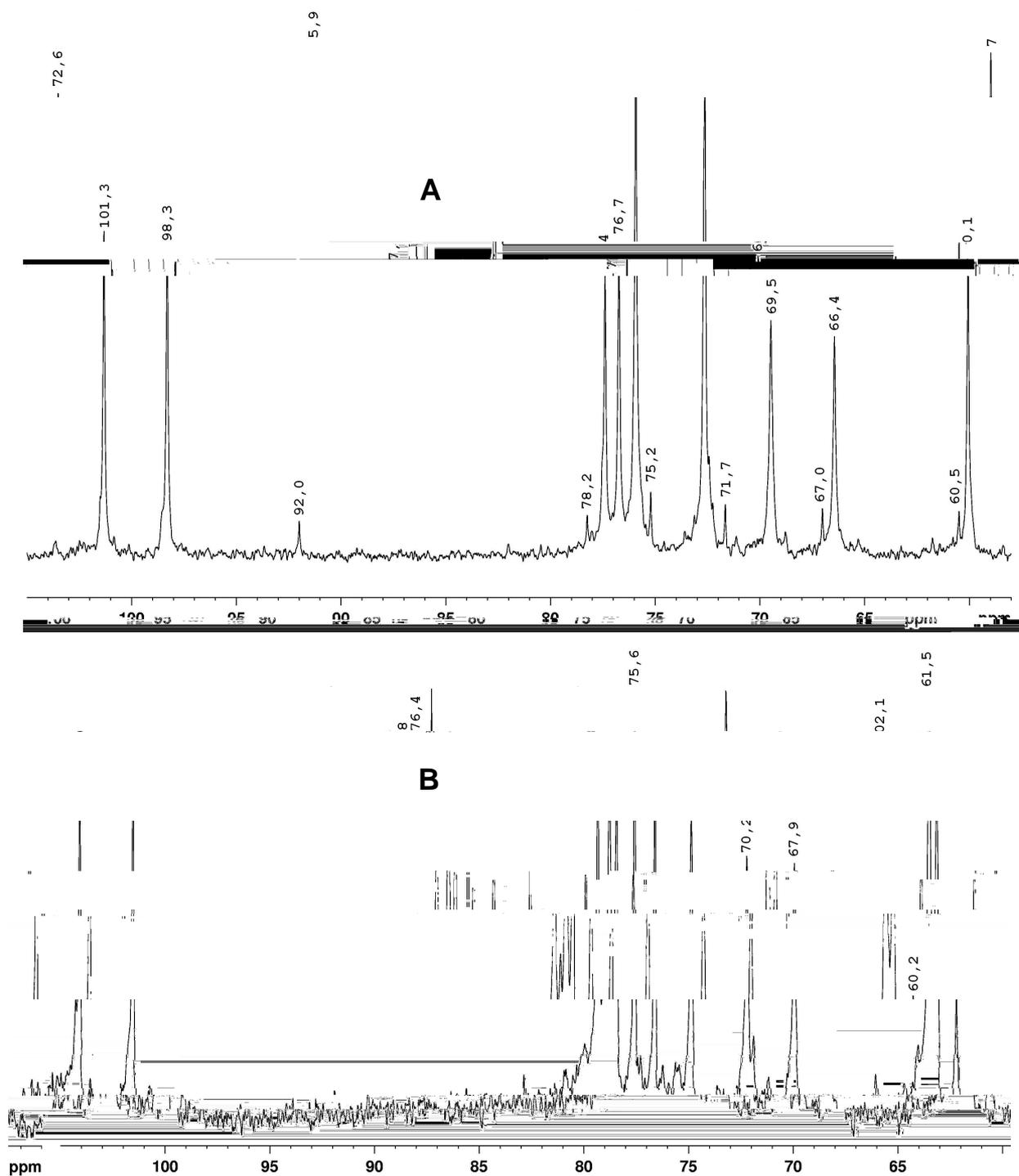


FIGURA 26: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração HPy (A) e HPy-CR (B), obtidas após a hidrólise parcial de VTy e carboxirredução da fração HPy, respectivamente. Análise realizada com “probe” de 5 mm, 50 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

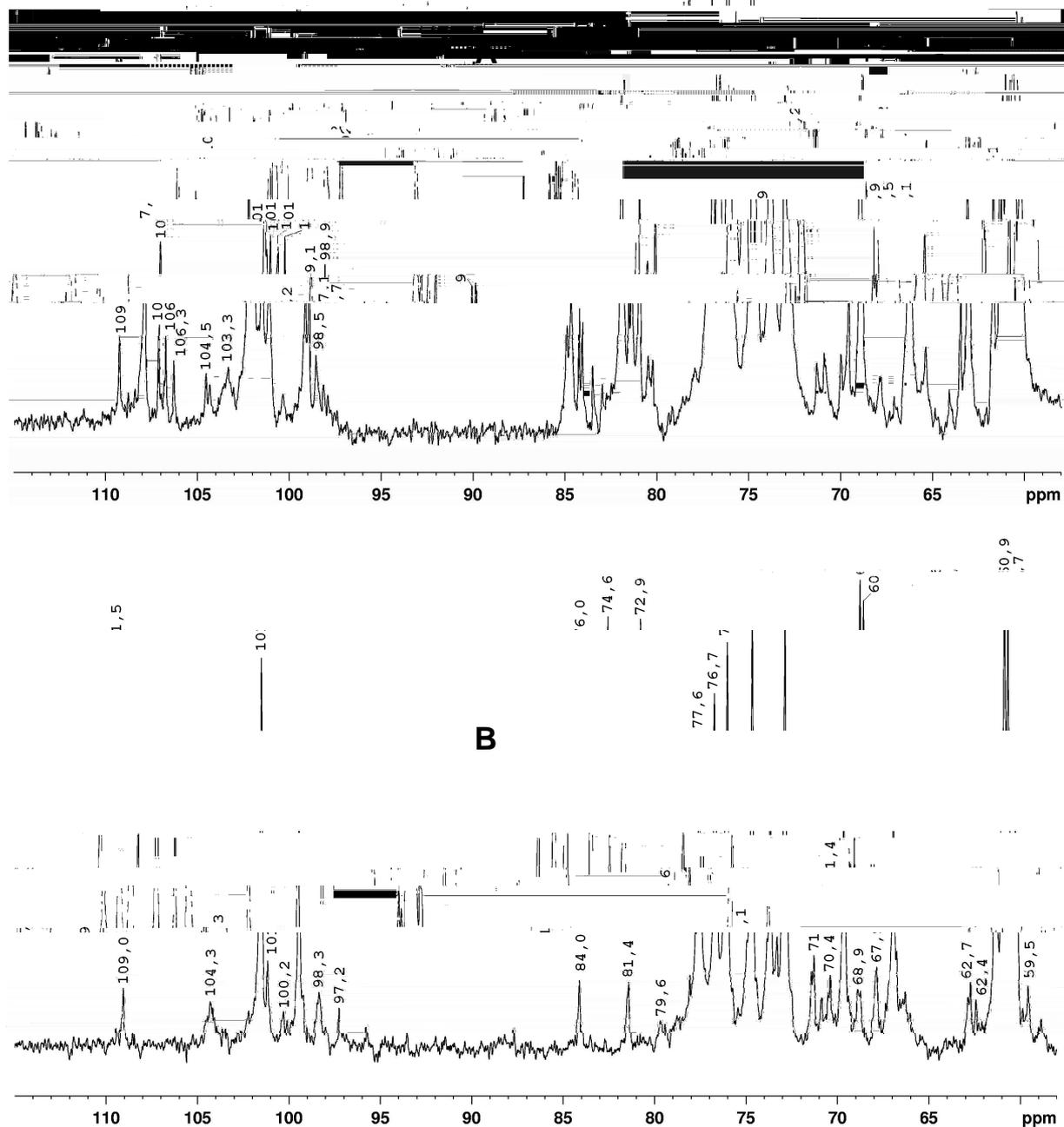


FIGURA 27: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  das frações  $\text{CR}_3\text{y}$  (A) e  $\text{Sy-CR}_3$  (B), obtidas após a carboxirredução de  $\text{VTy}$  e após degradação controlada de Smith de  $\text{CR}_3\text{y}$ , respectivamente. Análise realizada com “probe” de 5 mm, 50 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

TABELA 11: Análises de metilação das frações polissacarídicas da goma de *V. thyrsoidea*: alditóis acetatos neutros parcialmente O-metilados obtidos das frações per-O-metiladas.

Derivados <sup>b</sup>	R <sub>t</sub> <sup>c</sup>	Frações (%) <sup>a</sup>					
		VTy	S <sub>1</sub> Y	CR <sub>3</sub> -Y	SMT-CR	HPy	HPy-CR
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	0,81	23	<sup>13</sup>	25	2	2	1
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara	0,83	3	1	8	-	-	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xil	0,85	3	-	4	-	-	-
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	0,96	1	1	-	-	-	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0,99	Tr	6	-	3	3	4
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1,00	Tr	-	-	1	2	4
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,05	8	8	8	5	4	2
5-Me-Ara	1, <sup>13</sup>	2	3	1	1	-	-
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1,28	5	8	3	34	76	48
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1,35	4	9	6	14	1	5
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1,37	-	-	12	20	-	32
4,6-Me <sub>2</sub> -Man	1,63	38	26	17	12	10	4
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1,70	10	25	12	3	-	-
2,6-Me <sub>2</sub> -Glc	1,75	-	-	4	3	-	-
2-Me-Gal	2,60	3	-	-	2	-	-

<sup>a</sup> % relativa à área total do pico; valores < 1% não estão incluídos

<sup>b</sup> O-Metil alditol acetatos analisados por GC-MS.

<sup>c</sup> Tempo de retenção relativo ao do derivado of 2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol

A cadeia principal deste polissacarídeo é evidenciada pela presença dos derivados 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (5%) e 4,6-Me<sub>2</sub>-Man (38%). Este dado revela que grande parte das unidades de manose está 2,3-di-O substituída. Esta substituição ocorre por cadeias laterais de β-Galp 3-O substituídas, podendo estas mesmas cadeias estarem ramificadas, ou ainda por unidades simples de Ara, Xil ou Gal.

Quando foi realizado um ciclo de degradação controlada de Smith gerando a fração S<sub>1</sub>y, ocorreu uma diminuição nos terminais não redutores de Ara<sub>f</sub> (13%), além da remoção completa dos terminais não redutores de Xil<sub>p</sub>. As cadeias laterais de Gal<sub>p</sub> 3-O

substituídas também ficam menos ramificadas, como é visto pelo aumento dos derivados 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal (9%) e 2,6-Me<sub>2</sub>-Gal (25%). Juntamente com este dado uma diminuição nas substituições da cadeia principal, pois ocorre uma diminuição do derivado 4,6-Me<sub>2</sub>-Man e um aumento nos derivados 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man (6%) e 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (8%), mostrando que as unidades de Man<sub>p</sub> 2-O substituídas fazem parte da cadeia principal.

#### 4.4 Oligossacarídeos da goma de *V. thyrsoidea*

A procura por oligossacarídeos livres redutores foi inicialmente realizada no sobrenadante etanólico proveniente da extração aquosa, através de cromatografia em papel e por CCD. Por estes métodos foi possível observar que no sobrenadante etanólico existia uma grande quantidade de monossacarídeo livre, que por comparação com os padrões utilizados tratava-se de arabinose. Um banda de intensidade muito fraca próximo a origem ( $R_{Gal}$  0,2) foi observada, mas com o pouco conteúdo de sobrenadante etanólico seria inviável purificar este componente.

Então a estratégia utilizada para se obter oligossacarídeos foi a hidrólise ácida parcial, que tanto serviu para produzir um polissacarídeo mais simples para a análise como para produzir oligossacarídeos que ajudassem na elucidação da estrutura do polissacarídeo. O polissacarídeo VTy foi hidrolisado com TFA 0,5 M, durante 4 h a 100 °C. Em seguida, sem realizar a neutralização do material, esta solução foi adicionada a um excesso de etanol (3 x v) para primeiramente precipitar o polissacarídeo hidrolisado parcialmente. O sobrenadante etanólico foi concentrado em evaporador rotatório para retirar tanto o TFA, quanto o etanol e depois foi liofilizado.

Ao se retirar o material do liofilizador e coletar uma amostra para realizar o “screening” por cromatografia em papel, verificou-se que o pH da solução encontrava-se ácido ainda, ou seja, ainda restava TFA no material. Para retirar este TFA foi necessário solubilizar o material novamente em água e realizar algumas liofilizações seguidas, pois não era a intenção neutralizar com alguma base para não formar sal na amostra, o que poderia atrapalhar no momento de realizar a purificação.

Após 3 liofilizações o pH da solução já estava em torno de 5,0-6,0, o que possibilitou a análise por cromatografia em papel e CCD. A cromatografia em papel analítica foi realizada com o solvente 1:1:1 (*n*-buOH:piridina:H<sub>2</sub>O; v/v) e a revelação foi feita com nitrato de prata em meio alcalino. Esta análise mostrou duas bandas principais com  $R_{Lactose}$  de 0,3 e 0,8. Três cromatografias preparativas foram realizadas em papel Whatman 3MM para se isolar estes dois componentes. Após a extração dos oligossacarídeos do papel foi realizada, os oligossacarídeos foram pesados e para o oligossacarídeo com  $R_{Lactose}$  de 0,8 (R08-Y) foram isoladas 42 mg, enquanto para o

oligossacarídeo com  $R_{\text{Lactose}}$  de 0,3 (R03-Y) foram isoladas 21 mg. Esta quantidade foi mais que a suficiente para se realizar todas as análises necessárias para a determinação das suas estruturas.

Primeiramente foram realizados os espectros de RMN mono e bidimensionais. Analisando-se o oligossacarídeo R08-Y, o espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (FIGURA 28A) pode-se verificar que este apresenta apenas 4 sinais na região de carbono anomérico com dois sinais principais em  $\delta$  101,6 e 92,0 e outros dois sinais e menor intensidade em  $\delta$  103,6 e 93,7.

Através dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e HMQC (FIGURA 28B) foi possível estabelecer a relação entre os prótons e os carbonos, e determinar que o oligossacarídeo em questão era um dissacarídeo, onde os sinais de carbono anomérico em  $\delta$  93,7 e 92,0 são referentes à unidade de D-Manp redutora,  $\beta$ - e  $\alpha$ -respectivamente, com sinais de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  4,99 e 5,34, respectivamente. Já o sinal em  $\delta$  101,6 corresponde ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-GlcpA quando este está ligado à  $\alpha$ -D-Manp e o sinal em  $\delta$  103,6 corresponde ao C-1 de  $\beta$ -D-GlcpA ligado à  $\beta$ -D-Manp. Os sinais de  $^1\text{H}$  para estas unidades são de  $\delta$  4,55 (quando  $^1\text{H}$  está ligado à  $\alpha$ -D-Manp) e de  $\delta$  4,65 (quando  $^1\text{H}$  está ligado à  $\beta$ -D-Manp). Este mesmo dissacarídeo já foi isolado para a goma de *V. lehmannelii* e os assinalamentos são os mesmos e correspondem com os dados obtidos (WAGNER et al., 2004).

Através do espectro de COSY (FIGURA 28C) foi possível definir que o H-2 de  $\alpha$ -D-Manp era  $\delta$  4,14, o de  $\beta$ -D-Manp 4,196, enquanto o H-2 de  $\beta$ -D-GlcpA ligado em  $\alpha$ -D-Manp é  $\delta$  3,45 e quando ligado em  $\beta$ -D-Manp fica em  $\delta$  4,51. Os demais prótons e carbonos não foram assinalados. No espectro de TOCSY (FIGURA 28D) é possível verificar o acoplamento de H-1 das unidades de  $\alpha$ -D-Manp com seu H-2 em  $\delta$  4,14 e os acoplamentos de H-1 de  $\beta$ -D-GlcpA com  $\delta$  3,77; 3,59 e 3,45, mas não foi possível assinalar os carbonos através do espectro de HMQC.

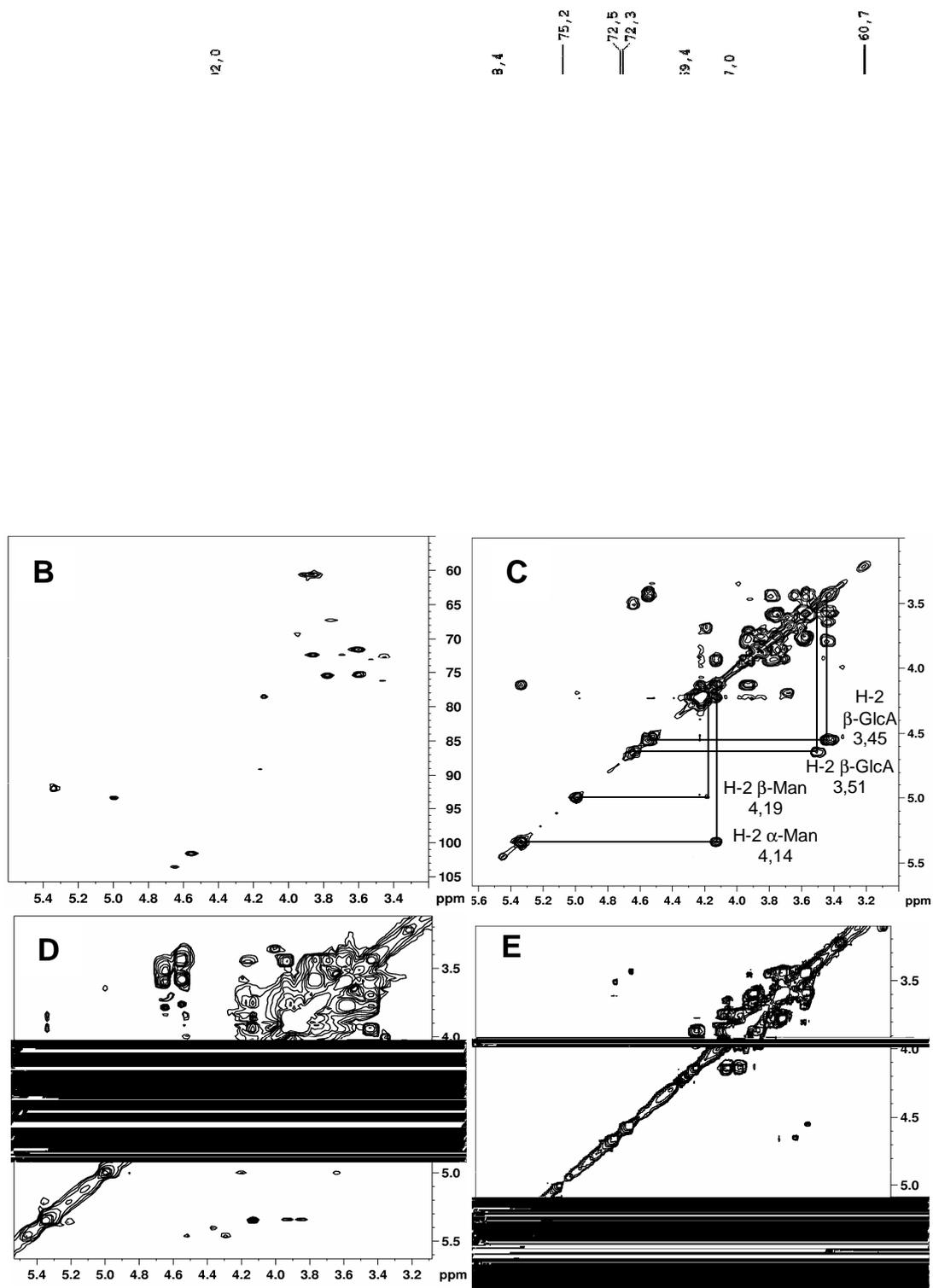


FIGURA 28: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (A), HMQC (B), COSY (C), TOCSY (D) e ROESY (E) do oligossacarídeo R08-Y isolado por hidrólise parcial do polissacarídeo VTy da goma de *V. thyrsoidea*. Análise realizada com “probe” de 5 mm, 70 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

No espectro de ROESY (FIGURA 28E) seria de se esperar que houvesse um acoplamento entre H-1 de  $\beta$ -D-Glc $p$ A e o H-2 de  $\alpha$ -D-Man $p$ , mas este acoplamento não foi observado.

A metilação deste oligossacarídeo mostrou que apenas o derivado 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man estava presente, pois o derivado os derivados ácidos não são analisados na coluna utilizada.

O espectro de ESI-MS do oligossacarídeo R08-Y forneceu dados que confirmam a presença do dissacarídeo. O íon molecular com relação  $m/z$  355 (FIGURA 29A) é condizente com a presença de uma unidade de ácido hexurônico unida com uma unidade de hexose. A fragmentação deste íon molecular (FIGURA 29B) gera um fragmento principal de  $m/z$  193, compatível com uma unidade de ácido urônico e gerado pela remoção de uma hexose.

O outro oligossacarídeo R03-Y apresentou um espectro de RMN-<sup>13</sup>C com 6 sinais na região de carbono anomérico (FIGURA 30A), destes 6 sinais 4 correspondem aos sinais vistos no espectro do oligossacarídeo R08-Y, indicando que uma estrutura semelhante àquela possa estar presente neste oligossacarídeo.

Os sinais em  $\delta$  92,2 e 93,7 correspondem ao C-1 da unidade de D-Man $p$  redutora,  $\alpha$  e  $\beta$  respectivamente. O sinal em  $\delta$  101,6 ao C-1 da unidade de  $\beta$ -D-Glc $p$ A ligado à unidade de  $\alpha$ -D-Man $p$  redutora, enquanto o sinal em  $\delta$  103,7 ao C-1 de  $\beta$ -D-Glc $p$ A ligado à unidade de  $\beta$ -D-Man $p$  redutora. Sobraram os sinais em  $\delta$  98,3 e 101,6 que quando se compara o espectro deste oligossacarídeo com aquele do polissacarídeo da hidrólise parcial (HPy), os sinais são os mesmos, então temos que estes outros dois sinais são equivalentes à  $\alpha$ -D-Man $p$  2-O substituída ( $\delta$  98,3) e à  $\beta$ -D-Glc $p$ A ligado a  $\alpha$ -D-Man $p$ .

Desta forma, o oligossacarídeo R03-Y é um tetrassacarídeo com unidades alternadas de Man e GlcA, sendo Man a unidade redutora e GlcA o terminal não redutor. Através do espectro de HMQC (FIGURA 30B) pode-se assinalar os prótons dos carbonos anoméricos e pelo espectro de COSY (FIGURA 30C) assinalar os prótons para as unidades de  $\beta$ -D-Glc $p$ A quando esta está ligada à unidade de  $\alpha$ -D-Man $p$  redutora e à unidade de  $\beta$ -D-Man $p$  redutora (TABELA 12). Para o terminal não redutor de  $\beta$ -D-Glc $p$ A não foi possível fazer os assinalamentos devido a uma sobreposição tanto

no espectro de HMQC quanto no espectro de COSY. Para a unidade de  $\alpha$ -D-Manp intermediária foi possível fazer o assinalamento até H-2.

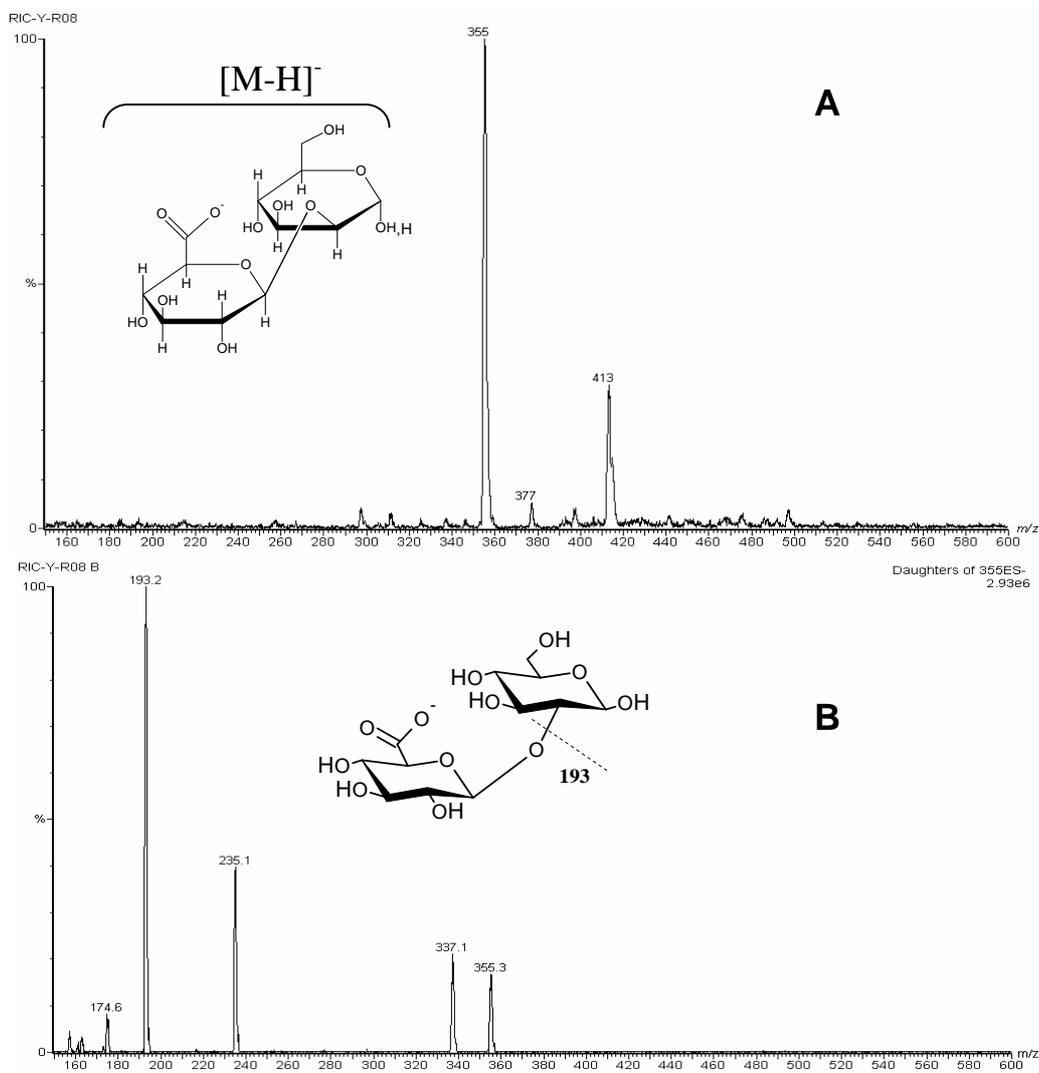


FIGURA 29: Espectro de ESI-MS do oligossacarídeo R08-Y em modo negativo. O íon molecular é mostrado em (A) e a fragmentação do íon molecular em (B).

Com o espectro de TOCSY (FIGURA 30D) estes assinalamentos foram visualizados e confirmados, mas não ocorreram acoplamentos no espectro de ROESY (FIGURA 30E).

A estrutura proposta foi confirmada através da análise de ESI-MS, onde o íon molecular com  $m/z$  693 corresponde a um tetrassacarídeo composto de 2 unidades de ácido urônico e 2 unidades de hexose (FIGURA 31A) e a fragmentação deste íon molecular (FIGURA 31B) produz os fragmentos 513 (-Man), 355 (-GlcA) e 193 (-Man). Com estes dados foi possível concluir que realmente trata-se do oligossacarídeo  $\beta$ -D-Glc $p$ A-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man $p$ -(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glc $p$ A-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$  $\beta$ -D-Man $p$ .

TABELA 12: Assinalamentos de alguns carbonos e prótons para o oligossacarídeo R03-Y a partir dos espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , HMQC, COSY e TOCSY.

	C-1/H-1*	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H5	C-6/H-6
$\alpha$ -D-Man redutora	92,0/4,87	3,65				
$\beta$ -D-Man redutora	93,4/4,53	3,72				
$\beta$ -D-Glc $p$ A	101,6/4,11	3,00	3,29	3,43	3,15	174,2/-
$\alpha$ -D-Man	98,3/5,00	78,4/3,78				
$\beta$ -D-Glc $p$ A	103,6/4,21	3,12	3,43	3,53	3,31	174,2/-

\* Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

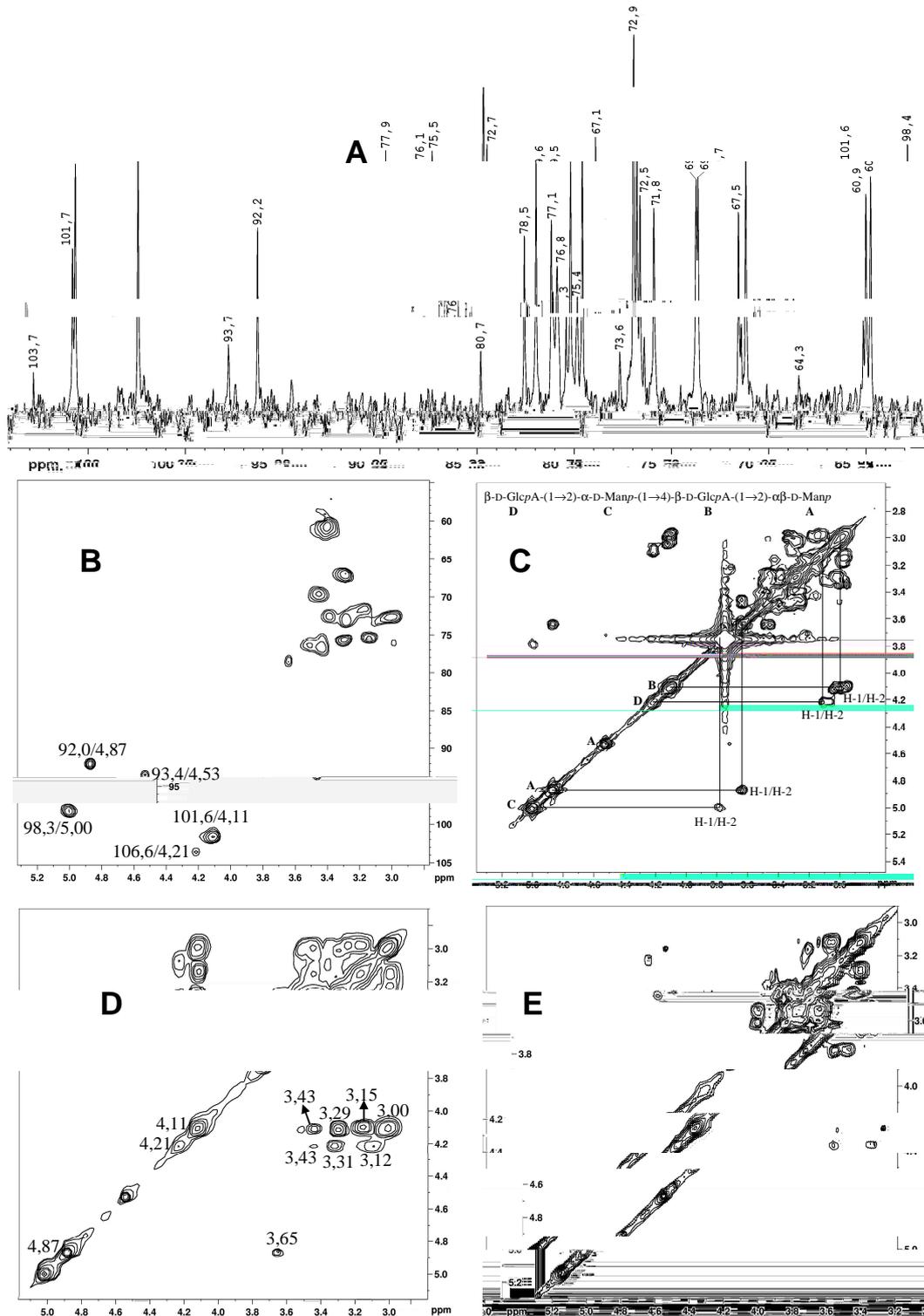


FIGURA 30: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (A), HMQC (B), COSY (C), TOCSY (D) e ROESY (E) do oligossacarídeo R03-Y isolado por hidrólise parcial do polissacarídeo VTy da goma de *V. thyrsoidea*. Análise realizada com “probe” de 5 mm, 70 °C, em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm.

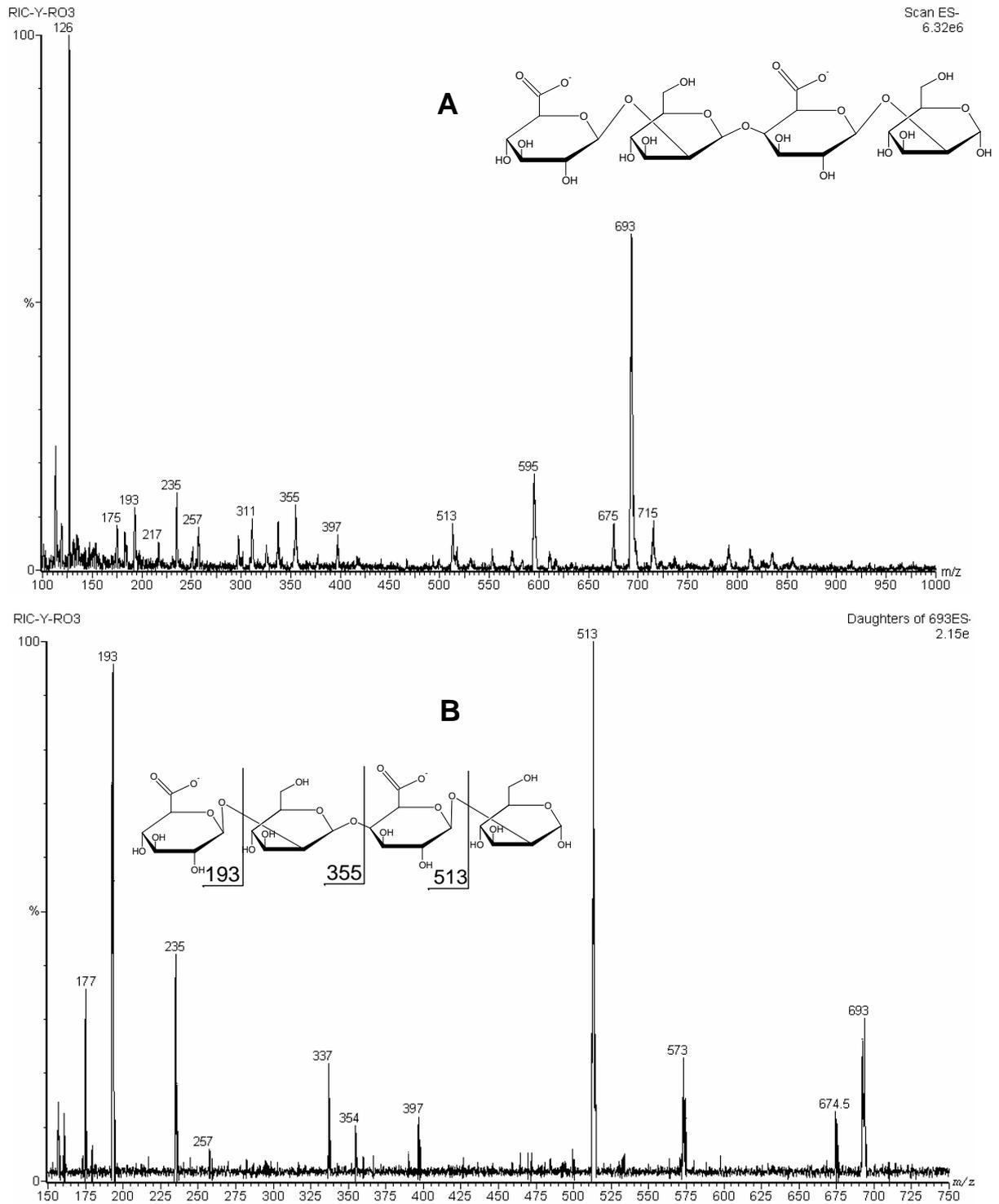


FIGURA 31: Espectro de ESI-MS do oligossacarídeo R03-Y em modo negativo. O íon molecular é mostrado em (A) e a fragmentação do íon molecular de  $m/z$  693 em (B).

## 4.5 Perspectivas

As gomas de *V. tucanorum* e *V. thyrsoidea* apresentam-se como polissacarídeos complexos, sendo a cadeia principal composta por unidades alternadas de  $\alpha$ -D-Manp substituídas em O-2 e unidades de  $\beta$ -D-GlcpA substituídas em O-4, constituindo glucuronomananas. As cadeias laterais são complexas e ramificadas, sendo em sua maioria composta por unidades de  $\beta$ -D-Galp O-3 substituídas. Estas gomas ainda apresentam uma alta percentagem de arabinose, estas podendo ser terminais não redutores ou ainda ser substituintes diretos na cadeia principal.

As espécies em questão estão correlacionadas com a outra espécie já estudada, *V. lehmannii*, que também apresenta como polissacarídeo constituinte de sua goma uma glucuronomanana como cadeia principal, mas com baixo grau de substituição, apresentando-se muito mais simples que as duas espécies agora estudadas.

Uma das possíveis aplicações para estas gomas, e que pode ser testada posteriormente, é sua potencialidade como agente anticoagulante/anti-trombótico, uma vez que apresentam uma grande relação de grupamentos ácidos e apresentam alta solubilidade em água, como a heparina. Para a verificação deste potencial uso deve-se analisar a goma nativa e modificada quimicamente por sulfatação. A grande quantidade de ácido urônico presente pode ser um diferencial nas moléculas até agora estudadas no Grupo de Química de Carboidratos da Pós-graduação em Bioquímica. Agora com a estrutura já determinada e com as perspectivas de continuidade da pesquisa, abrem-se novos horizontes para estes polissacarídeos.

O grande interesse no estudo destas gomas foi também a abertura do Grupo a novos parceiros, como a ESALQ, que não trabalha diretamente com os polissacarídeos, mas tem grande interesse em descobrir novos subprodutos da madeira que possam ser utilizados. E é neste campo que se abrem também perspectivas de integração entre a pesquisa e a sociedade, o que pode levar a um bem estar social, econômico e porque não dizer de satisfação em ver seus conhecimentos podendo ser utilizados em benefício de muitas outras pessoas que não só os do meio acadêmico.

Não deixando o pensamento acadêmico de lado, verifica-se o que é normalmente visto para gomas e também para outros polissacarídeos, que dentro do mesmo gênero ocorre a presença de um padrão de polissacarídeo. Mas este dado leva a outros pensamentos críticos, pois verifica-se que na literatura outros polissacarídeos relacionados à estrutura encontrada nestas gomas são encontrados nas gomas de ameixa (*Prunus domestica* var. *insititia*), cereja (*P. cerasus*) e na goma ghatti (*Anogeissus leiocarpus*). Nestas espécies também foram encontrados polissacarídeos denominados de glucuronomananas e de onde isolaram também o dissacarídeo  $\beta$ -D-GlcpA-(1→2)- $\alpha$  $\beta$ -D-Man $\rho$  por hidrólise ácida. E a pergunta a ser primeiramente formulada é: qual é a relação entre estas espécies pertencentes a gêneros diferentes produzir o mesmo tipo de polissacarídeo em um exsudato?

Ao se distribuir estas espécies em um mapa, nota-se que as três espécies de *Vochysia* estudadas encontram-se exclusivamente nas Américas. A ameixa é de origem romana ou da área do Cáucaso (Turquia e Irã), a cereja originária do leste europeu e sudoeste da Ásia, enquanto a goma ghatti é encontrada no sul da Ásia, Península Arábica e norte da África.

Esta especulação tem direcionamento para as questões de evolução e sistemática vegetal, uma vez que poderia existir um ancestral comum entre as espécies em questão. Considerando que as regiões acima faziam parte de um mesmo bloco continental (FIGURA 32) e só vieram a se dividir em eras posteriores com a separação continental. Aprofundando um pouco mais da especulação, mas sem deixar de considerar as suas cadeias principais como critério para quimiotipagem, seria interessante investigar se não existe nenhuma espécie que produza este mesmo tipo de polissacarídeo no continente australiano, o que daria mais subsídios para esta proposta.

Tantas idéias, tantos possíveis caminhos para se seguir, só mostram que a pesquisa não caminha sozinha e que somente vêm somar conhecimentos as mais diversas áreas. Por mais básica que seja a pesquisa realizada ela sempre tem o seu valor, pois sem uma base sólida não se constrói conhecimento.

Como as espécies estudadas possuem polissacarídeos com diferentes graus de ramificação, uma hipótese para esta diferença tão brusca entre eles pode ser o local

onde os mesmos foram coletados. Enquanto as gomas estudadas neste trabalho foram coletadas na região de cerrado, onde as árvores estão mais expostas a intempéries naturais como secas e queimadas, a goma de *V. lehmannii* foi coletada no Acre, onde a temperatura é mais constante e a planta está sujeita a menos estresse ambiental. Condições mais adversas podem estimular a produção de polissacarídeos mais complexos, enquanto que condições mais amenas podem fazer com que este polissacarídeo exsudato possa ser mais simples.

Com maior ou menor complexidade estrutural, as 3 espécies em questão produzem um polissacarídeo com a mesma estrutura central, uma glucuronomanana como cadeia principal. E a diferença de complexidade pode ser advinda de uma adaptação que estas espécies possam ter adquirido para se desenvolverem no ambiente em que estão.

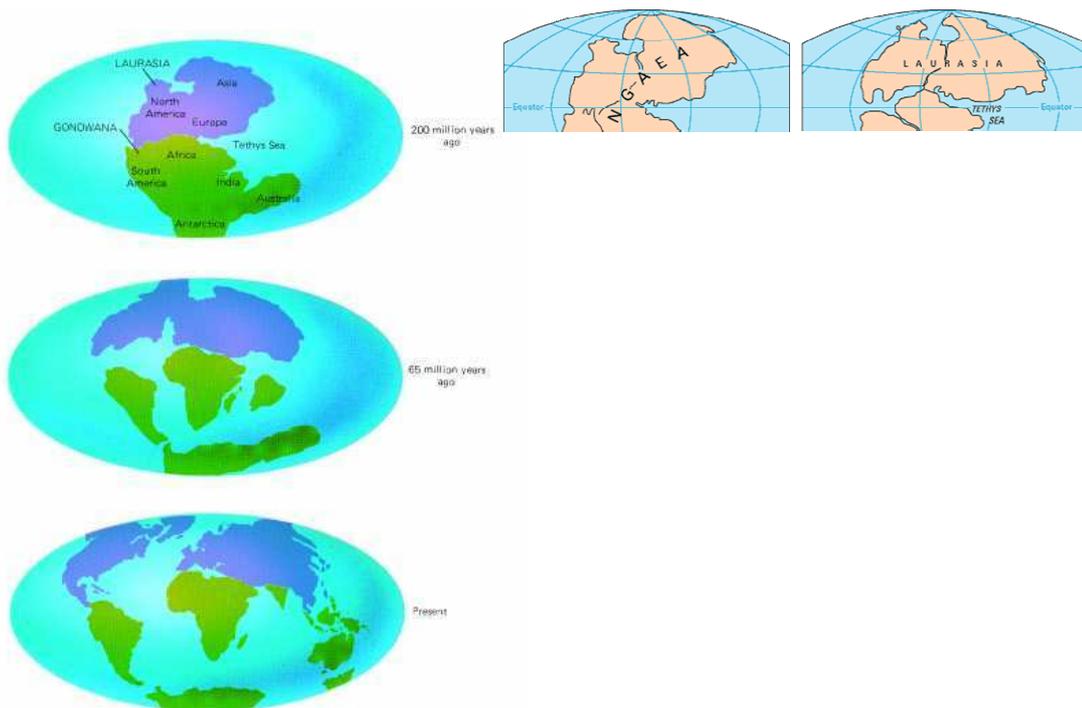


FIGURA 32: Ilustrações mostrando o bloco continental denominado Pangea antes da separação continental. Fonte: disponível em [www.geology.com/pangea-continental-drift.gif](http://www.geology.com/pangea-continental-drift.gif)

## 5 CONCLUSÕES

O polissacarídeo presente na goma de *V. tucanorum*, uma glucuronomanana, apresentou dois componentes de massa molecular diferentes que puderam ser separados. Este polissacarídeo possui uma unidade repetitiva da cadeia principal formada por  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ ). Nesta cadeia principal encontram-se substituições em O-3, tanto nas unidades de manose quanto nas unidades de ácido glucurônico. Estas substituições são formadas por cadeias laterais de  $\beta$ -D-Galp 3-O substituídas, podendo estas cadeias serem substituídas por cadeias menores ou unidades simples de  $\alpha$ -L-Araf.

A identificação do ácido glucurônico, foi realizada através da carboxirredução utilizando NaBD<sub>4</sub> e posterior análise em GC-MS ou ainda através dos dados de metilação do material carboxirreduzido.

Como oligossacarídeos livres redutores estavam presentes nesta goma uma  $\beta$ -D-xilana 4-O substituída, em pequena quantidade, e uma mistura de oligossacarídeos que não foram separados, mas que é condizente com a estrutura Ara<sub>4</sub>-Hex<sub>2</sub> ( $\alpha$ -L-Araf- $\alpha$ -L-Araf- $\alpha$ -L-Araf- $\alpha$ -L-Araf--Hexp-(1 $\rightarrow$ 2)-Man).

O polissacarídeo da goma de *V. thyrsoidea* também é uma glucuronomanana, mas apresenta-se menos ramificado que o polissacarídeo da goma de *V. tucanorum*, comprovado através da comparação dos espectros de RMN-<sup>13</sup>C. O produto de hidrólise parcial, resultado obtido nas duas gomas, mostrou um espectro com apenas dois sinais na região de carbono anomérico, o que remete ao espectro do polissacarídeo da goma de *V. lehmannii*.

Quando este produto de hidrólise parcial foi carboxirreduzido verificou-se a presença de glucose, indicando que o ácido urônico presente é o ácido glucurônico. Isso ocorreu pela formação de glucuronolactona durante o processo de hidrólise e que no passo seguinte era reduzida pela presença de NaBD<sub>4</sub> para glucose. Esta observação levou a um experimento simples, que deve ser realizado em materiais que apresentem ácido glucurônico, a quebra da lactona formada antes da redução dos monossacarídeos com NH<sub>4</sub>OH, evitando assim o aparecimento de glucose na composição monossacarídica.

Ao se comparar os polissacarídeos das gomas de *V. tucanorum* e *V. thyrsoidea* com o polissacarídeo da goma de *V. lehmannii*, observa-se que o polissacarídeo de *V. lehmannii* é um polímero muito mais simples que os outros dois, com poucas ramificações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI, A. **GUM ARABIC**. RAW MATERIALS RESEARCH AND DEVELOPMENT COUNCIL, 2004.

Retirado de: <http://www.rmrdc.gov.ng/Surveyreport2005/Gum%20Arabic.pdf>. Acesso em 12 de dezembro de 2006.

ANGHER, A.J. (org.) **Vade Mecum acadêmico de direito**. 3ª ed. São Paulo: Rideel, 2006.

ASPINALL, G.O. Gums and mucilages. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, London: Academic Press, v. 24. p. 333-379, 1969.

ASPINALL, G.O. Isolation and fractionation of polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, v. 1, p. 19-26, 1982.

BELESKI-CARNEIRO, E.B.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Structural aspects of the exudate from the fruit of *Chorisia speciosa* St. Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 219-224, 1999.

BeMILLER, J.N. **Industrial Gums**. Encyclopaedia of Polymer Science and Engineering, John Wiley & Sons, v. 7, p. 589, 1987.

CARBONERO, E. R.; SMIDERLE, F. R.; GRACHER, A. H. P.; MELLINGER, C. G.; TORRI, G.; AHTI, T.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63 (1), p. 13-18, 2006.

CHIKAMAI, B. Production, markets and quality control of gum arabic in Africa: findings and recommendations from an FAO project. In: Mugah, J.O.; Chikamai, B. N.; Mbiru, S.S.; Casadei, E. (eds.) **Proceedings of a regional conference for Africa held in**

**Nairobi**, Kenya, 6 - 10 October 1997. Retirado de: <http://www.fao.org/docrep/X0098E/x0098e00.HTM> , acessado em 12 de dezembro de 2006.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p.209-217, 1984.

DELGOBO, C.L. **Estudo parcial do polissacarídeo do exsudato de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco)**. Tese de mestrado, Departamento de Bioquímica, UFPR, 1993.

DELGOBO, C.L.; GORIN, P.A.J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47(7), p.1207-1214, 1998.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v 28, p. 350-356, 1956.

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. In: GLICK, D. (ed) **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v. 3, p. 111- 152, 1956.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; PETRÁKOVÁ, E.; HRINCOVINI, M. Structural features of a water-soluble L-arabino-D-xylan from rye bran. **Carbohydrate Research**, v. 198, p. 57-66, 1990.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v.197, p.157-162,1991.

GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharide by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 361-69, 1965.

GORIN, P.A.J.; HORITSU, K.; SPENCER, J.F.T. An exocellular mannan, alternately linked 1,3- $\beta$ - and 1,4- $\beta$ - from *Rhodoturula glutinis*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 43, p. 950-954, 1965.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, p. 1212-1224, 1975.

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, p. 119-132, 1984.

GORIN, P.A.J.; DELGOBO, C.L.; TISCHER, C.A.; IACOMINI, M. Recent advances in structural analysis of polysaccharides present in plant gum exudates with the aid of accompanying free, reducing oligosaccharides. In: VERLI, H. (ed.) **Insights into Carbohydrate Structure and Biological Function**. India: Transworld Research Network, p. 145-159, 2006.

GUTIÉRREZ DE G, O.; MARTÍNEZ, M.; SANABRIA, L.; LEÓN DE PINTO, G.; IGARTUBURU, M. 1D- AND 2D-NMR spectroscopy studies of the polysaccharide gum from *Spondias purpúrea* var. *lutea*. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 37-43, 2005.

HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 357- 360, 1965.

HOUGH, L.; JONES, J.K.N. Chromatography. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 21-31, 1962(a).

HOUGH, L.; JONES, J.K.N. Chromatography. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 4-7, 1962(b).

HOUGH, L.; JONES, J.K.N. Chromatography. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 7-8, 1962(c).

IRAKI, N.M.; SINGH, N. BRESSAN, R.A.; CARPITA, C.N. Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. **Plant Physiology**, v. 91, p. 48-53, 1989.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução a taxonomia vegetal. 12<sup>a</sup> ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

JOSELEAU, J.P.; CHAMBAT, G.; VIGNON, M.; BARNOUD, F. Chemical and <sup>13</sup>C NMR studies on two arabinans from the inner bark of *Rosa glauca*. **Carbohydrate Research**, v. 58, p. 165-175, 1977.

LEÓN DE PINTO, G.; GOTERA, O.G.; MARTÍNEZ, M.; OCANDO, E.; RIVAS, C. The molecular characterization of polysaccharide gum from *Laguncularia racemosa*. **Carbohydrate Polymers**, 35, p. 205-13, 1998.

LIMA, A.C.; SANTOS, R.A.; ALMEIDA, F.A.G.; BANDEIRA, C.T. Estimulantes químicos na extração da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.). **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.409-415, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo: Plantarum, v. 1, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2<sup>a</sup> Ed., São Paulo: Ed. Plantarum, v. 2, 1998.

MAURER-MENESTRINA, J.; SASSAKI, G.L.; SIMAS, F.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structure of a highly substituted  $\beta$ -xylan from the gum exudate of the palm *Livistona chinensis* (Chinese fan). **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1843-1850, 2003.

MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P.A.J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, nº 5, p. 715-721, 1998.

MENESTRINA, J.M. **Estrutura química do polissacarídeo e dos oligossacarídeos livres do exsudato de *Anacardium occidentale* L. (Cajueiro)**. Tese de doutorado. Departamento de Bioquímica, UFPR, 1999.

MHINZI, G.S.; MROSSO, H.D.J. Chemotaxonomic aspects of gum exudates from some Acacia species. *In*: J.O. Mugah, J.O.; Chikamai, B. N.; Mbiru, S.S.; Casadei, E. (eds.) **Proceedings of a regional conference for Africa held in Nairobi**, Kenya, 6 - 10 October 1997. Retirado de: <http://www.fao.org/docrep/X0098E/x0098e00.HTML>, acessado em 12 de dezembro de 2006.

PERLIN, A.S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-1-<sup>13</sup>C. **Tetrahedron Letters**, p. 2921-2924, 1969.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R.C.M.; COSTA, S.M.O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Ano III, n. 1, p. 31-36. 1993.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Technical Association of the Pulp and Paper Industry**, v. 37, p. 336-343. 1954.

SANDFORD, P.A.; BAIRD, J. Industrial utilisation of polysaccharides. *In*: Aspinall, G.O. (ed. ). **The Polysaccharides**, v. 2, Academic Press, pp. 412-485, 1983.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G.L. Comunicação pessoal, 2006.

SMITH, F.; JONES, J.K.N. Plant gums and mucilages. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 4, p. 243-283, 1949.

SMITH, F.; MONTGOMERY, R. **The Chemistry of plant gums and mucilages**. New York: Reinhold, 1959.

SIMAS, F. F.; REIS, R. A.; MENESTRINA, J. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Structural aspects of the polysaccharide from the gum exudate of *Syagrus romanzoffiana* (Queen palm). **Carbohydrate Polymers**, v. 63 (1), p. 30-39, 2006.

SIMAS, F.F.; GORIN, P.A.J.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; SASSAKI, G.L.; DELGOBO, C.L.; IACOMINI, M. Structure of a heteroxylan of gum exudate of the palm *Scheelea phalerata* (uricuri). **Phytochemistry**, v. 65 (16), p. 2347-2355, 2004.

SIMAS, F.F. Caracterização estrutural do polissacarídeo presente na goma do exsudato vegetal de *Scheelea phalerata* (uricuri). **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica, UFPR, 2004. 81p.

STEPHEN, A.M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. **The polysaccharides**. London: Academic Press, v. 2, p. 97-180, 1983.

STODDART, J.F.; JONES, J.K.N. Some structural features of *Citrus limonia* gum (lemon gum). **Carbohydrate Research**, 8, p. 29-42, 1968.

TAYLOR, R.L.; CONRAD, H.E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11 (8), p. 1383-88, 1972.

TISCHER, C.A.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum Arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 151-158, 2002. (a)

TISCHER, C.A.; IACOMINI, M.; WAGNER, R.; GORIN, P.A.J. New structural features of the polysaccharide from gum ghatti (*Anogeissus latifolia*). **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2205-2210, 2002. (b)

TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms, **Nature**, v. 166, p. 444, 1950.

WAGNER, R. Determinação da estrutura química do polissacarídeo presente na goma de *Vochysia* sp. (quaruba). **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica, UFPR, 2003, 57p.

WAGNER, R.; WORANOVICZ-BARREIRA, S.M.; IACOMINI, M.; DELGOBO, C.L.; PIMENTEL, N.M.; GORIN, P.A.J. Structure of a glycoglucuronomannan from the low-viscosity gum of *Vochysia lehmannii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 269-275, 2004.

WHISTLER, R.L. Introduction to industrial gums. *In*: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. (eds.) **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. London: Academic Press, 3<sup>a</sup> ed., p 1-20, 1993.

WHISTLER, R.L.; DURSO, D.F. Chromatographic separation of sugars on charcoal. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, 677-679, 1950.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York, v. 2, p. 211-215, 1963(a).

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 2, p. 65-67, 1963(b).

# **ANEXOS**



## Structure of a glycoglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia tucanorum* (family Vochysiaceae)

Ricardo Wagner<sup>a</sup>, Fernanda F. Simas<sup>a</sup>, Graciele C.Z. Pereira<sup>a</sup>, Aline Angeli<sup>b</sup>, José O. Brito<sup>b</sup>, Sandra M. Woranovicz-Barreira<sup>c</sup>, Cirene L. Delgobo<sup>d</sup>, Guilherme L. Sassaki<sup>a</sup>, Marcello Iacomini<sup>a</sup>, Philip A.J. Gorin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CxP 000, 515 - 0 Curitibá, PR, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Engenharia Florestal, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, CxP 087, 13611-900 Piracicaba, SP, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, 000 - 0 Curitibá, PR, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 000 - 0 Florianópolis, SC, Brazil

Received 8 November 2006; received in revised form 10 January 2007; accepted 11 January 2007

Available online 19 January 2007

### Abstract

The polysaccharide (VTP) from the gum exudate of *Vochysia tucanorum* gave aqueous solutions of low viscosity. VTP contained two components, which on freeze–thawing, gave rise to soluble (S-VTP) and precipitated (P-VTP) fractions, with  $M_w$  350,000 and 520,000 g/mol, and  $dn/dc$  0.134 and 0.139, respectively. Acid hydrolysis of S-VTP provided Ara, Xyl, Man, Gal, Glc in a 43:1:5:18:2 molar ratio (GC–MS) with 31% uronic acid, whereas the values for P-VTP were 51:1:5:16:2 and 25%, respectively. Methylation analysis of S-VTP revealed 11 neutral, partially *O*-methylated alditol acetates, mainly from nonreducing end- (31%) and 5-*O*-substituted Araf (9%), 3-*O*- (16%) and 3,4-di-*O*-substituted Galp (9%), and 2,3-di-*O*-substituted Manp units (10%); P-VTP was similar, containing the same structures, consistent with their almost identical <sup>13</sup>C NMR spectra. Partial hydrolysis of P-VTP removed side chains giving rise to the main chain (PH4h) of  $\beta$ -D-GlcpA-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  4)- repeating groups. A controlled Smith degradation of S-VTP gave a polysaccharide (S<sub>1</sub>-SVTP), shown by methylation analysis to contain  $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-Galp-,  $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-Galp-,  $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$  3)[ $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-Galp-, and  $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -D-Manp- groups, with the Araf region probably containing some additional, oxidized 5-*O*-substituted L-Araf units. This agreed with the structure of a polysaccharide (PH30), formed by milder hydrolysis of P-VTP, sufficient to only remove Araf groups. For a more reliable characterization and quantification of S-VTP structures, it was subjected to two carbodiimide reductions and methylation analysis of the product (CR<sub>2</sub>-SVTP) showed the former GlcpA units to be 3,4-di-*O*-substituted. Minute amounts of a (1  $\rightarrow$  4)-linked  $\beta$ -D-xylan were present in the gum, along with free reducing oligosaccharides. ESI-MS–MS, <sup>13</sup>C NMR, and methylation analysis showed Ara-Gal-Man side-chain sequences similar to those of the glycoglucuronomannan. Mainly present was Ara<sub>4</sub>-Hex<sub>2</sub>, whose daughter ions were Ara<sub>3</sub>-Hex<sub>2</sub>, and Ara<sub>2</sub>. The oligosaccharide mixture contained nonreducing end-, 2-*O*- and 3-*O*-substituted Araf, internal 3-*O*- and 3,4-di-*O*-substituted internal Galp, and 2-*O*-substituted Manp reducing end-units. The glycoglucuronomannan of *Vochysia lehmannii* gum, although having the same main-chain, contained less side-chains. © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords** Glycoglucuronomannan; *Vochysia tucanorum*; Chemotaxonomy; Free oligosaccharides;  $\beta$ -D-Xylan

### 1. Introduction

The family Vochysiaceae comprises approximately 7 genera and 200 species, among which is *Vochysia tucano-*

*rum*. The tree grows in the transition zone between the Brazilian savannah and Atlantic forest. A natural gum exudate occurs on its trunk and is reported to be a food for monkeys (Almeida, Proença, Sano, & Ribeiro, 1998). When dissolved in water, it forms solutions with low viscosity, similar to the gum from *Vochysia lehmannii* (Wagner et al., 2004).

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1670; fax: +55 41 3266 2042.  
E-mail address [cesarat@ufpr.br](mailto:cesarat@ufpr.br) (P.A.J. Gorin).

Many trees and shrubs produce gum when stressed naturally by temperature, lack of humidity, insect attack, and by manual cutting.

The gum from *V. lehmannii* contained a glycolglucuronomannan, with a repeating  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-GlcpA-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  group in its main chain, lightly substituted with complex side-chains (Wagner et al., 2004).

We now report structural analyses on the glycolglucuronomannan of *V. tucanorum* gum, and traces of free, reducing oligosaccharides and a  $\beta$ -D-xylan.

## 2. Experimental

### *Vochysia tucanorum* gum

The gum was collected from the trunk of a tree growing in a sub-tropical region, near Piracicaba, State of São Paulo, Brazil: the tree was identified by Aline Angeli and José Otávio Brito, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

### Preparation of VTP, S-VTP, and P-VTP polysaccharides

The gum (200 g) dissolved almost completely in H<sub>2</sub>O (300 mL) and the remaining debris was removed by filtration, followed by centrifugation. The supernatant was added to excess EtOH (3 $\times$ ) to give a precipitate (VTP; 65 g) and a portion (50 g) was dissolved in H<sub>2</sub>O (200 mL), which was frozen, thawed gently at 4 °C, and resulting insoluble material was removed by centrifugation and isolated to give P-VTP (18 g). The aqueous supernatant was treated with excess EtOH to give a precipitate of S-VTP (32 g). Both polysaccharide fractions were analyzed along with components of supernatant I (Fig. 1), which was partially evaporated to give a moist residue containing oligosaccharides and  $\beta$ -xylan (see Section 2.8).

### Partial hydrolyses of P-VTP

P-VTP (400 mg) was partially hydrolyzed with 0.5 M TFA (300 mL) at 100 °C for 30 min. to remove the  $\alpha$ -L-Araf units and to reveal units of  $\beta$ -D-Galp and  $\alpha$ -D-Manp. The solution was partially evaporated and treated with excess EtOH to give precipitated polysaccharide PH30 (39% yield).

In order to prepare the main chain of P-VTP, it (3.0 g) was partially hydrolyzed with 0.5 M TFA (300 mL) at 100 °C for 4 h to give, using the same procedure, PH4h (yield 20%).

### Monosaccharide composition of polysaccharides

Each sample (1 mg) was analyzed for uronic acid content using an *m*-hydroxydiphenyl colorimetric method, in

which neutral sugars do not interfere (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991).

Other samples were hydrolyzed with 2 M TFA for 8 h at 100 °C, and the product was successively reduced with NaBD<sub>4</sub> and acetylated with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1, v/v) at 100 °C for 1 h. The resulting alditol acetates mixtures were analyzed by GC-MS (Jansson, Kenne, Liedgren, Lindberg, & Lönngrén, 1976), using a Saturn 2000 model installed with a capillary DB-225 column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.), programmed from 50 °C (1 min) at 40 °C/min to 220 °C (then hold), with He as carrier gas.

### Controlled Smith degradation of S-VTP

The polysaccharide (5.0 g) was dissolved in H<sub>2</sub>O (250 mL) containing NaIO<sub>4</sub> (2.7 g). After 72 h, ethylene glycol (3.0 mL) was added and the solution dialyzed for 2 days against tap H<sub>2</sub>O. NaBH<sub>4</sub> (2.0 g) was then added and after 24 h the solution was acidified to pH 6.0 with HOAc and dialyzed. The solution was evaporated to 100 mL, adjusted to pH 2.0 with dil. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and kept at 100 °C for 40 min (Gorin, Horitsu, & Spencer, 1965), neutralized (BaCO<sub>3</sub>), filtered, and the filtrate evaporated to a small volume. Addition to excess EtOH gave S<sub>1</sub>-SVTP (1.0 g).

### Carboxy-reduction of S-VTP

S-VTP (350 mg) was submitted to two successive carboxy-reduction cycles according to Taylor & Conrad (1972) to give CR<sub>1</sub>-SVTP (205 mg) and then CR<sub>2</sub>-SVTP (190 mg). Another portion (10 mg) was successively carboxy-reduced using NaBD<sub>4</sub> and hydrolyzed with 2 M TFA at 100 °C for 8 h and the derived alditol acetates were analyzed by GC-MS to determine the deuteration patterns in the of glucitol and galactitol derivatives (Jansson et al., 1976).

### Methylation analysis of polysaccharides

Samples (1 mg) of S-VTP, P-VTP, S<sub>1</sub>-SVTP, CR<sub>2</sub>-SVTP, PH30, PH4h, and  $\beta$ -xylan were each per-*O*-methylated by the method of Ciucanu & Kerek (1983). The products were then partially hydrolyzed with 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v, 1 mL) for 1 h at 4 °C (Saeman, Moore, Mitchell, & Millet, 1954), after which the solution was diluted to 1 M and maintained for 16 h at 100 °C for complete hydrolysis. The solution was neutralized (BaCO<sub>3</sub>), filtered, and the filtrate evaporated to give a residue of partially *O*-methylated aldoses, which was converted to their corresponding mono-deuterated *O*-methyl alditol acetates by successive treatments with NaBD<sub>4</sub> and Ac<sub>2</sub>O-pyridine. GC-MS was carried out on the mixture, as in Section 2.4, and its components were identified by their typical retention times and e.i breakdown patterns, using standard samples containing all possible isomers, (Sasaki, Gorin, Souza, Czelusniak, & Iacomini, 2005), with the exception of 4,6-di-*O*-methyl-

galactitol acetate, which was examined in a separate experiment.

#### Isolation of EtOH-soluble oligosaccharides and $\beta$ -D-xylan

The EtOH-soluble fraction obtained on precipitation of polysaccharide (Section 2.2) contained mainly arabinose and galactose (PC in *n*-BuOH-pyridine-H<sub>2</sub>O, 5:3:3); developed with AgNO<sub>3</sub>-NaOH (Trevelyan, Procter, & Harrison, 1950), and a trace of oligosaccharides. To obtain the latter, the mixture was applied to a charcoal-Celite column (Whistler & Durso, 1950). It was eluted with H<sub>2</sub>O, followed by 5%, 10%, 20%, and 40% aq. EtOH. PC examination showed that the oligosaccharides were present in the 10% and 20% aq. EtOH eluates and these were combined and applied to a 25 × 3 cm i.d. Sephadex LH-20 gel permeation column (Amersham Bioscience—dead volume = 13 mL). Elution with H<sub>2</sub>O gave four fractions (Fig. 5), the elution profile being followed by the phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956) using a micro-technique in 96-well plates. Fraction 2 contained  $\beta$ -D-xylan (5.0 mg) and fraction 4 oligosaccharides (9.0 mg), which were both further investigated.

#### ESI-MS and ESI-MS-MS of oligosaccharide mixture

ESI-MS examination of the oligosaccharide fraction 4 was carried out using a Micromass Quattro LC spectrometer. The sample (1  $\mu$ g/mL) was dissolved in H<sub>2</sub>O to which CH<sub>3</sub>CN was added to give a 1:1 mixture. It was applied using a manual loop injector (10  $\mu$ L volume) on to a flow rate of 20  $\mu$ L/min of the 1:1 solvent. The cone voltage was 88 V and the capillary voltage 3.64 kV. The analysis was carried out in the +ve mode from *m/z* 100 to 1200. MS-MS was carried out using a collision energy of 139.9 eV.

#### <sup>13</sup>C NMR spectra

NMR spectra were obtained with a Bruker 400 MHz DRX Avance spectrometer from solutions in 99.9% D<sub>2</sub>O at 50 °C (shifts are expressed as  $\delta$  ppm, relative to external Me<sub>4</sub>Si,  $\delta$  = 0).

#### HPSEC analysis

The molecular weight distribution of S-VTP and P-VTP was determined using Wyatt Technology equipment incorporating ultrahydrogel columns 2000, 500, 250, and 120, connected to a differential refractometer (model 2410, Waters) and a laser light scattering detector, at 632.8 nm (Dawn DSPF model). The eluant was aq. 0.1 M NaNO<sub>2</sub> + 0.2 g/L NaN<sub>3</sub>, at a flow rate of 0.6 mL/min. The samples were dissolved in aq. NaNO<sub>2</sub> (1 mg/mL) and filtered through a cellulose membrane with an average

pore diameter of 0.2  $\mu$ m: a volume of 100  $\mu$ L was injected into the apparatus. Results were provided directly with the aid of computer software ASTRA 4.70.07.

### 3. Results

#### Fractionation, *M<sub>w</sub>* values, and analysis of polysaccharide components

The gum from *V. tucanorum* dissolved almost completely in water at room temperature and after removal of debris, EtOH precipitation gave rise to polysaccharide VTP (33%). This was subjected to fractionation, derivatization, and analysis procedures (Fig. 1).

HPSEC examination, using a refractive index detector, showed it to be heterogeneous (Fig. 2a). Fractionation by freeze-thawing of the aqueous solution gave soluble S-VTP (24%) and precipitated P-VTP (12%; yields based on original gum), and each was homogeneous by HPSEC with *M<sub>w</sub>* 350,000 g/mol (*dn/dc* 0.134) and 520,000 (*dn/dc* 0.139), respectively (Fig. 2b). They had similar monosaccharide compositions and provided molar ratios of Ara, Xyl, Man, Gal, Glc, and uronic acid of 43:1:5:18:2:31 and 51:1:5:16:2:25, respectively (Table 1), and although the uronic acid contents were accurate, the percentages of the neutral monosaccharides depended on those liberated by hydrolysis followed by GC-MS of derived alditol acetates, the mannose contents being low due to the resistance of glucuronosyl-mannose to hydrolysis. The <sup>13</sup>C NMR spectra of S-VTP and P-VTP were also almost identical (Fig. 3a and b), with at least 5 high-frequency C-1 signals at  $\delta$  106.8–108.8 corresponding to  $\alpha$ -L-Araf units (Joseleau, Chambat, Vignon, & Barnoud, 1977).

In the following analyses, insoluble P-VTP was used for partial hydrolyses since it dissolved rapidly in the reaction medium, whereas soluble S-VTP was employed in the controlled Smith degradation and carbodiimide reduction, since complete dissolution would not occur rapidly.

#### Partial hydrolysis products from P-VTP

Partial hydrolysis of P-VTP with 0.5 M TFA at 100 °C for 30 min gave rise to a polysaccharide PH30 (39% yield). Complete hydrolysis gave Ara, Man, Gal, and Glc in a 2:23:45:5 molar ratio (GC-MS) with 26% uronic acid (Table 1); the presence of Glc is due to reduction of glucuronolactone in the preparation of alditol acetates. High frequency C-1 signals of  $\alpha$ -L-Araf units were absent in the <sup>13</sup>C NMR spectrum of PH30 (Fig. 4a) and the signal at  $\delta$  103.5 was from  $\beta$ -D-Galp units, whose high frequency and *J* = 164 Hz (<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H coupled spectrum, not shown) showed a  $\beta$ -configuration (Perlin & Casu, 1969). Another prominent signal at  $\delta$  98.3, *J* = 174 Hz was from  $\alpha$ -D-Manp units.

Under stronger conditions of 0.5 M TFA at 100 °C, for 4 h, polysaccharide PH4h (20% yield) was formed. It provided Man, Gal, and Glc in a 39:4:18 molar ratio on acid

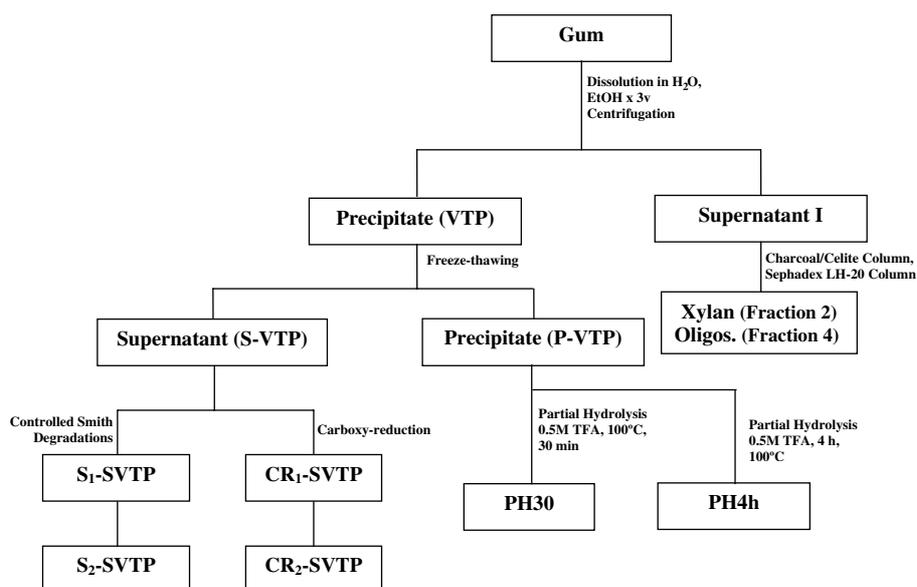


Fig. 1. Fractionation and isolation of polysaccharide components.

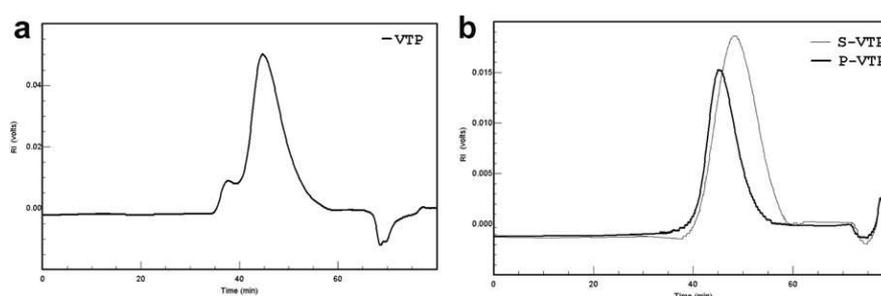


Fig. 2. HPSEC profiles, using a refractive index detector, of VTP (a), and both S-VTP and P-VTP (b).

Table 1  
Monosaccharide composition of fractions obtained from gum of *V. tucanorum*<sup>a</sup>

Polysaccharide	Uronic acid	Ara	Xyl	Man <sup>b</sup>	Gal	Glc
S-VTP	31	43	1	5	18	2
P-VTP	25	51	1	5	16	2
PH30	26	2	–	23	45	5
PH4h	39	–	–	39	4	18
S <sub>1</sub> -SVTP	19	21	1	9	46	4
CR <sub>1</sub> -SVTP	9	43	1	11	28	8
CR <sub>2</sub> -SVTP	4	43	1	13	29	10

<sup>a</sup> Neutral monosaccharides were estimated by hydrolysis, followed by GC–MS of derived alditol acetates, and the uronic acid content was determined colorimetrically.

<sup>b</sup> In the case of uronic-acid containing polymers, the proportion of mannose can be low, due to its incomplete liberation, with formation of aldobiouronic acid.

hydrolysis (GC–MS) and contained 39% uronic acid (Table 1). The <sup>13</sup>C NMR spectrum of PH4h contained 11 main signals showing a two-unit repeating group (Fig. 4b), with signals analogous to those of β-D-GlcpA-(1 → 2)-α-D-Manp-(1 → 4)-β-D-GlcpA-(1 → 2)-D-Man, isolated via par-

tial hydrolysis of the glycolglucuronomannan of *Vochysia lehmannii* (Wagner et al., 2004).

Assignment of the eleven signals arising from repeating groups of the -(1 → 4)-β-D-GlcpA-(1 → 2)-α-D-Manp-main-chain, with C-1 signals from β-D-GlcpA at δ 101.6 and α-D-Manp at δ 98.4, was carried out. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of PH4h (not shown) contained two main H-1 signals, one at δ 5.44 with a *J* value too small to be detected (α-D-Manp), and the other at δ 4.53, *J* = 7.6 Hz (β-D-GlcpA). For assignment of other <sup>1</sup>H signals of β-D-GlcpA units, initial TOCSY and COSY approaches were used. The TOCSY spectrum (Fig. 4c) showed four correlations of H-1 of β-D-GlcpA until H-5, and COSY (not shown) identified these as follows: δ 3.44 (H-2), 3.73 (H-3), 3.57 (H-5), and 3.84 (H-4). The HMQC spectrum (Fig. 4d) was incomplete, with <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C correlation of nuclei (N) of N-1 (δ 4.53/101.6), N-2 (δ 3.44/72.9), N-3 (δ 3.73/76.6), and N-4 (δ 3.84/77.1). That of N-5 did not appear, but it should be at δ 3.57/77.0, based on the unassigned <sup>13</sup>C signal. For assignment of the α-D-Manp signals, TOCSY showed correlation of H-1 at δ 5.44 up to H-2 at δ 4.18 (Fig. 4c), a limitation which also appeared in COSY. HMQC gave an N-1 at δ 5.44/98.4 and an N-2 signal at

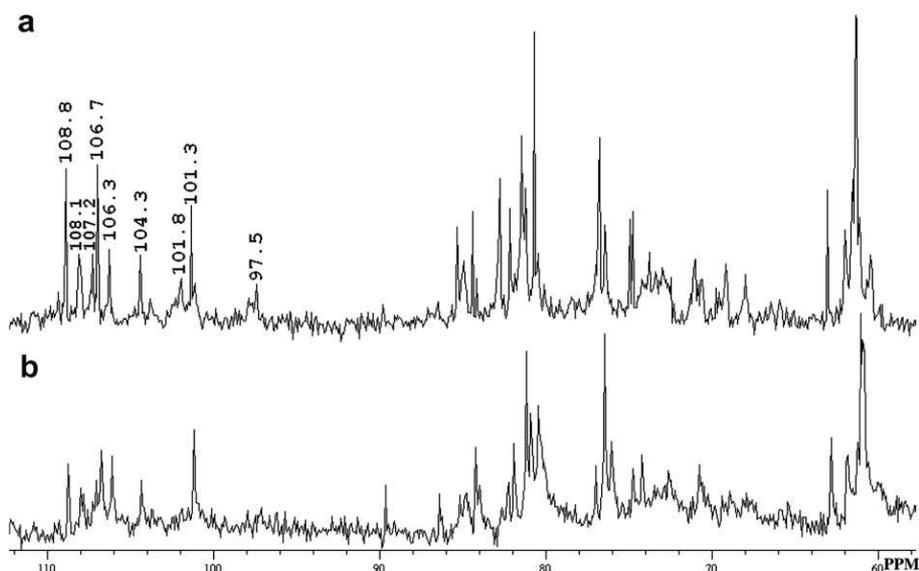


Fig. 3.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of S-VTP (a) and P-VTP (b), obtained at 50 °C in  $\text{D}_2\text{O}$ : numerical values are in  $\delta$  ppm.

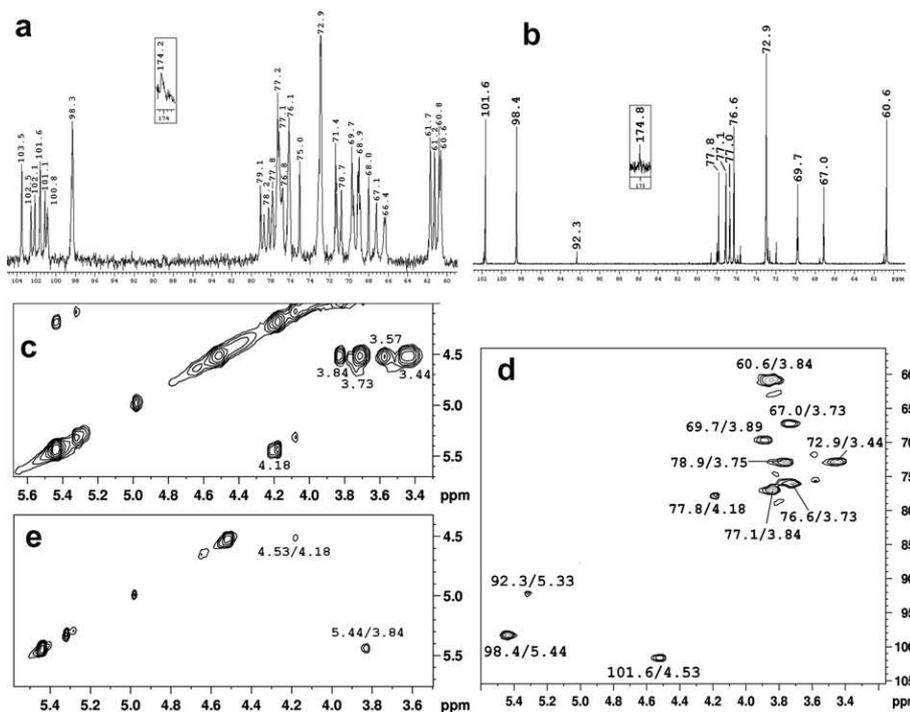


Fig. 4.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of products formed by progressive partial hydrolysis of P-VTP to form PH30 (a) and then PH4h (b). TOCSY (c), HMQC (d), and ROESY spectra (e) of PH4h, obtained at 50 °C in  $\text{D}_2\text{O}$ : numerical values are in  $\delta$  ppm.

$\delta$  4.18/77.8 (Fig. 4d). The other  $^{13}\text{C}$  signals were assigned by comparison with shifts of Me  $\alpha$ -D-Manp and Me  $\beta$ -D-GlcpA (Gorin & Mazurek, 1975). The three signals at lowest frequencies (Fig. 4b) could only arise from  $\alpha$ -D-Manp units and the assignments are  $\delta$  60.6 (C-6), 67.0 (C-4) and 69.7 (C-3). Consistent with the structure of PH4h, its ROESY (Fig. 4e) showed correlation of H-1 of  $\beta$ -D-GlcpA at  $\delta$  4.53 with H-2 of  $\alpha$ -D-Manp at  $\delta$  4.18 and H-1 of  $\alpha$ -D-

Manp at  $\delta$  5.44 with H-4 of  $\beta$ -D-GlcpA at  $\delta$  3.84. The above assignments for PH4h spectra are summarized in Table 3.

#### Controlled Smith degradation of S-VTP

A controlled Smith degradation (Gorin et al., 1965) was carried out on S-VTP to give a polysaccharide ( $\text{S}_1$ -SVTP; 20% yield), which provided on hydrolysis Ara, Xyl, Man,

Gal, and Glc in a 21:1:9:46:4 molar ratio (GC–MS): 19% of uronic acid was present (Table 1). The overall analysis data showed that S-VTP (and P-VTP) had main chains consisting of  $-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}$  repeating groups, substituted by branched side-chains.

### Carboxy-reductions of S-VTP

In order to determine the *O*-substitution positions on the uronic acid, S-VTP was carboxy-reduced to give CR<sub>1</sub>-SVTP, which provided on hydrolysis Ara, Xyl, Man, Gal, and Glc in a 43:1:11:28:8 molar ratio (GC–MS) with 9% uronic acid, and since the latter content was high, it was reduced again to give CR<sub>2</sub>-SVTP with respective values of 43:1:13:29:10 and 4% (Table 1). Since there were increases of values for Gal (18–29%) and Glc (2–10%), when compared with S-VTP, each one could have arisen from their respective uronic acid, so S-VTP was reduced with a carbodiimide system incorporating NaBD<sub>4</sub>. GC–MS of derived alditol acetates showed that glucitol acetate gave additional +2 Da ions with *m/z* 117, 129, 141, and 189 from its di-deuterated C-6, formed from GlcA units, whereas galactitol acetate had a non-deuterated C-6, showing that there were no GalA units.

### 5. Methylation analysis of selected polysaccharides

The <sup>13</sup>C NMR spectra of S-VTP (Fig. 3a) and P-VTP (Fig. 3b) were almost identical. In agreement, methylation analysis of S-VTP and P-VTP (Table 2) also gave rise to the same neutral, partially *O*-methylated derivatives, the main ones corresponding respectively to nonreducing end-units (31% and 31%), 3-*O*- (5% and 8%), and 5-*O*-substituted Araf (9% and 10%), 3-*O*- (16% and 17%), and 3,4-*O*-substituted Galp (9% and 9%), and 2,3-*O*-substituted Manp units (10% and 17%), as in structure 1.

Table 3

<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR assignments for the PH4h main chain, determined at 50 °C in D<sub>2</sub>O, numerical values are in  $\delta$  ppm

Nuclei	$\rightarrow 2\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1 \rightarrow$	$\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-}(1 \rightarrow$
C-1/H-1	98.4/5.44	101.6/4.53
C-2/H-2	77.8/4.18	72.9/3.44
C-3/H-3	69.7/3.89	76.6/3.73
C-4/H-4	67.0/3.73	77.1/3.84
C-5/H-5	72.9/3.89	77.0/3.57 <sup>a</sup>
C-6/H-6	60.6/3.84	174.8

<sup>a</sup> This resonance did not appear in the HMQC spectrum and the <sup>13</sup>C value was assigned by process of elimination.

The main-chain structure of the glycolglucuronomannan P-VTP was a repeating group of  $-\beta\text{-D-GlcpA}\text{-}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1 \rightarrow 4)$ , as represented by its partial hydrolysis product PH4h. As expected on methylation analysis, GC–MS gave almost exclusively (88%) of the partially *O*-methylated alditol acetates arising from 2-*O*-substituted Manp units (Table 2).

A series of methylation analyses were carried out on the glycolglucuronomannan and selected derivatives to determine its side-chain structures (Table 2). Twice, carboxy-reduced CR<sub>2</sub>-SVTP contained Glcp, instead of GlcpA units present in S-VTP and P-VTP, and a better characterization and quantification of each unit was possible. Mainly present were nonreducing end- (24%), 3-*O*- (6%) and 5-*O*-substituted Araf (2%), 3-*O*- (18%) and 3,4-*O*-substituted Galp (11%), 2,3-*O*-substituted Manp (18%), and 3,4-*O*-substituted Glcp (13%) units, the latter corresponding to GlcpA units in the former main chain.

Table 2 shows that a controlled Smith degradation of S-VTP to give S<sub>1</sub>-SVTP resulted in a decrease of nonreducing end-units of Araf from 31% to 10%, with the complete elimination of internal Araf units. The appearance of 2-*O*-substituted from 2,3-*O*-substituted Manp indicated

Table 2

Methylation analysis fractions from *V. tucanorum*: partially *O*-methylated, neutral alditol acetates obtained from per-*O*-methylated fractions

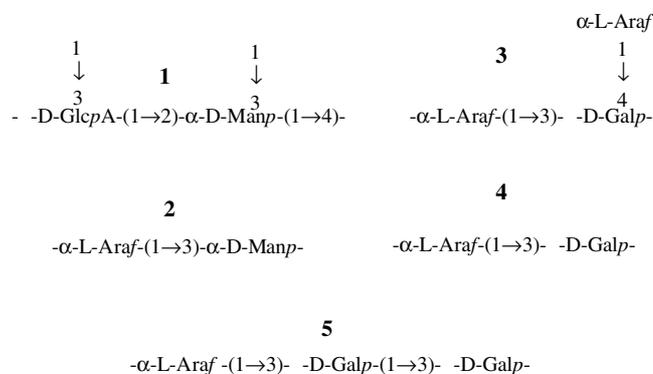
OMe alditol acetate <sup>b</sup>	% of total fragment area <sup>a</sup>						
	R <sub>t</sub> <sup>c</sup>	S-VTP	P-VTP	S <sub>1</sub> -SVTP	CR <sub>2</sub> -SVTP	PH30	PH4h
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	0.81	31	31	10	24	2	–
3,5-Me <sub>2</sub> -Ara	0.93	3	2	–	1	–	–
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	0.96	5	8	–	6	–	–
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.99	–	–	–	–	2	4
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	1.03	9	10	–	2	–	–
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.05	5	–	17	3	30	3
5-Me-Ara	1.13	3	5	–	3	–	–
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.28	3	1	12	2	19	88
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.35	16	17	33	18	16	–
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.37	3	–	–	5	–	–
4,6-Me <sub>2</sub> -Man	1.63	10	17	24	18	31	5
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1.70	9	9	4	11	–	–
2,6-Me <sub>2</sub> -Glc	1.75	–	–	–	13	–	–
2-Me-Gal	2.60	–	–	–	1	–	–

<sup>a</sup> % relative to total peak area; values <1% not included.

<sup>b</sup> *O*-Methyl alditol acetates analyzed by GC–MS.

<sup>c</sup> Retention time compared with that of 2,3,4,6-tetra-*O*-methylglucitol acetate.

the oxidation and removal of  $\alpha$ -Araf (structure 2) and 5-*O*-linked  $\alpha$ -Araf units. As Galp units were 3-*O*- and 3,4-di-*O*-substituted in the glycolglucuronomannan, the exposure of nonreducing end- (17%) and 3-*O*-substituted Galp



units (33%), should have arisen via removal of nonreducing Araf end-units, from structures 3, 4, and 5. Some periodate-oxidized 5-*O*-substituted Araf units could also be present.

The side chains of P-VTP were partially removed under mild hydrolytic conditions to give PH30. The Araf units were removed increasing the proportions, when compared to glycolglucuronomannan, of nonreducing end- of Galp (30%), and 2-*O*- (19%) and 2,3-di-*O*-substituted Manp units (31%), in agreement with the controlled Smith degradation data.

#### Free, reducing oligosaccharides of the gum and a $\beta$ -D-xylan

Free, reducing oligosaccharides are often present in gum exudates and their structures had similarities to those of the polysaccharide side-chains (Delgobo, Gorin, Jones, & Iacomini, 1998; Delgobo, Gorin, Tischer, & Iacomini, 1999; Maurer-Menestrina, Sasaki, Simas, Gorin, & Iacomini, 2003; Menestrina, Iacomini, Jones, & Gorin, 1998; Tischer, Gorin, & Iacomini, 2002; Tischer, Iacomini, & Gorin, 2002; Tischer, Iacomini, Wagner, & Gorin, 2002), and appear to be byproducts of polysaccharide synthesis. As they lend themselves better to NMR and ESI-MS-MS analysis, those of *V. tucanorum* gum were examined to provide further structural information as to the polysaccharide structures.

Supernatant I (Fig. 1), obtained from ethanol precipitation of VTP, contained mainly arabinose and galactose, and a small amount of mixed oligosaccharides. The mixture was applied to a column of charcoal-Celite, which was eluted with water to remove monosaccharides, followed by increasing concentrations of aqueous ethanol from 5% to 40%. Oligosaccharides were eluted with 10% and 20% aqueous ethanol, and these were combined and subjected to gel-permeation column chromatography on a Sephadex LH-20 column. Four fractions were obtained (Fig. 5), of which fraction 2, a (1  $\rightarrow$  4)-linked  $\beta$ -D-xylan, gave a  $^{13}$ C NMR spectrum with 5 typical signals (Fig. 6a) (Ebringerová, Hromádková,

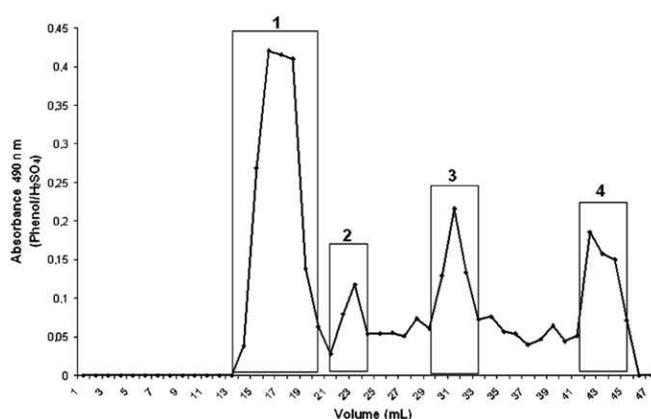
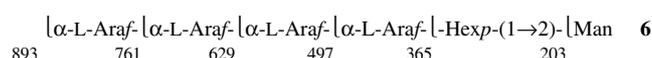


Fig. 5. Elution profile of Sephadex LH-20 column of the mixture, obtained by charcoal-Celite chromatography.

Petráková, & Hřincovini, 1990). The H-1 region of its  $^1$ H NMR spectrum (Fig. 6b) contained a signal corresponding to (1  $\rightarrow$  4)-linked  $\beta$ -D-Xylp units with  $\delta$  5.07,  $J = 7.7$  Hz, but with minor signals, which probably arise from  $\beta$ -D-GlcpA units of a hemicellulose.

Fraction 4 contained Ara, Man, and Gal in a molar ratio of 5:3:2 and was a mixture of oligosaccharides, as shown by ESI-MS. It gave main molecular ions ( $Na^+$  forms) with  $m/z$  893 ( $Ara_4-Hex_2$ ) > 1025 ( $Ara_5-Hex_2$ ) = 731 ( $Ara_4-Hex$ ) (Fig. 7a). A very small ion appeared at  $m/z$  1157, arising from  $Ara_6-Hex_2$ . MS-MS on the  $m/z$  893 ion (Fig. 7b) sequentially removed the Ara units to give daughter ions with  $m/z$  761 (-Ara), 629 (-Ara<sub>2</sub>),



497 (-Ara<sub>3</sub>), 365 (-Ara<sub>4</sub> = Hex<sub>2</sub>), and 203 (a hexose). These correspond to structure 6 (the glycosidic configurations and linkage were shown by NMR and methylation data: see below). An Ara<sub>2</sub> ion at  $m/z$  305 also appeared. The daughter ions of the  $m/z$  1025 ion were not so well sequenced, although one at  $m/z$  893 (-Ara) appeared, along with similar ions down to  $m/z$  497, but no further, possibly indicating a branched structure.

Methylation analysis of the mixture showed the presence of nonreducing end- (21%), 2-*O*- (12%), and 3-*O*-substituted Araf (10%), 3-*O*- (8%) and 3,4-di-*O*-substituted Galp (12%), and 2-*O*-substituted Manp units (37%). This and the ESI-MS results showed longer side chains than those present in glycolglucuronomannans S-VTP and P-VTP, with a higher proportion of 2-*O*-substituted Araf units. The oligosaccharide mixture gave a  $^{13}$ C NMR spectrum with main C-1 signals at high frequencies of  $\delta$  106.0 > 107.5 (Fig. 6c), showing  $\alpha$ -L-Araf units. Those of reducing end-units were at  $\delta$  91.7 and 93.9 and can be assigned to 2-*O*-glycosylated  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-Manp units respectively, by the following comparison with  $\beta$ -shifts obtained with 2-*O*-methylated derivatives (Gorin, 1975), in which the C-1 resonance of  $\alpha$ -D-Manp

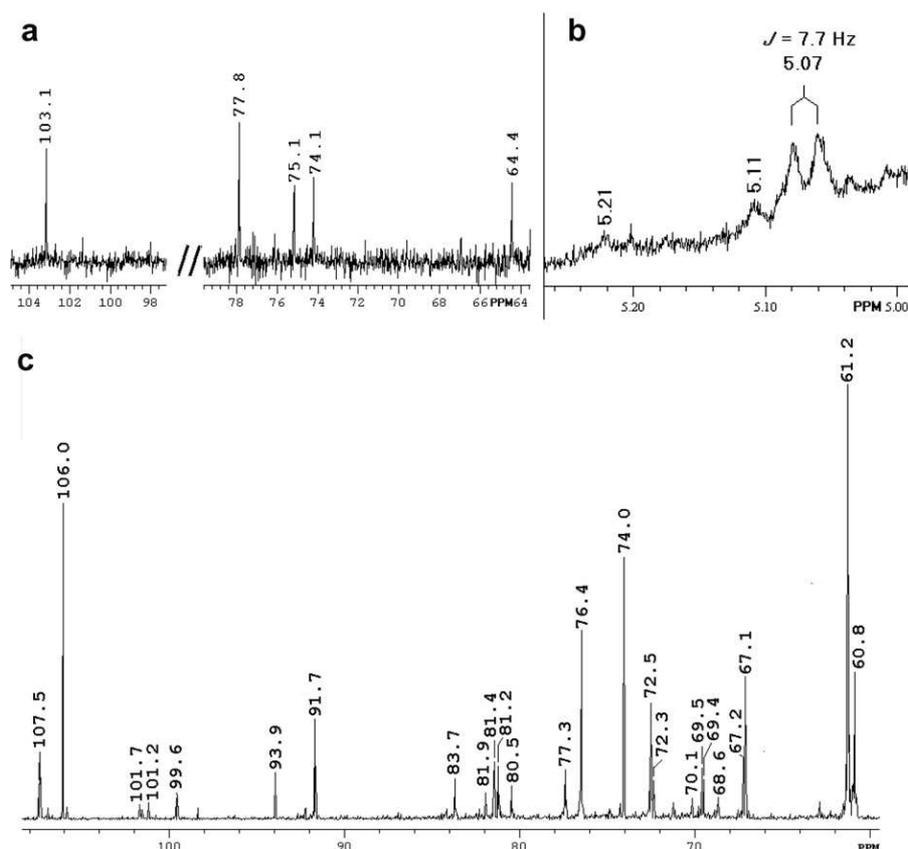


Fig. 6.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of (1  $\rightarrow$  4)-linked  $\beta$ -D-xylan (a), the H-1 portion of its  $^1\text{H}$  spectrum (b), and the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of oligosaccharide mixture (fraction 4, c), obtained at 50  $^\circ\text{C}$  in  $\text{D}_2\text{O}$ : numerical values are in  $\delta$  ppm.

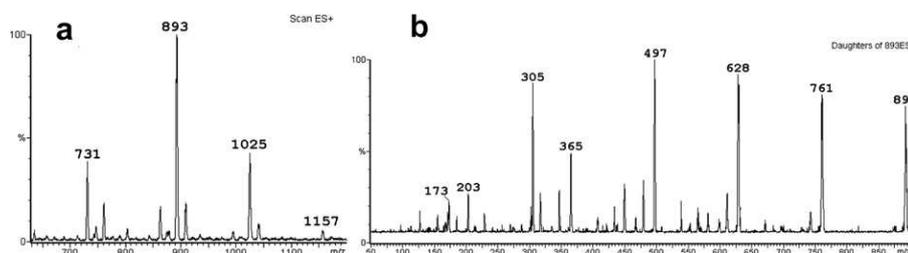


Fig. 7. ESI-MS profile of oligosaccharide mixture (fraction 4) isolated from Sephadex LH-20 column (a) and MS-MS of  $m/z$  893 ion (b).

appeared at  $\delta$  94.1 and that of  $\beta$ -D-Manp at  $\delta$  93.7. So considering the  $\beta$ -shifts of C-1 found on 2-*O*-methylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -mannose of  $-3.2$  and  $+0.4$  ppm, respectively, the present corresponding  $\beta$ -shifts would be  $-2.4$  and  $+0.2$  ppm, consistent with 2-*O*-glycosylation. These results indicate an arabinose–galactose–mannose sequence in oligosaccharide **6**. The oligosaccharide mixture could well contain both internal and nonreducing end-units of 2-*O*-substituted Manp, due to the high content of 34% found in the methylation analysis.

#### 4. Discussion

*Vochysia tucanorum* gum polysaccharide contained a main chain of  $\beta$ -D-GlcpA-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  4)-

repeating groups, substituted with side-chains at O-3 of each unit (**1**). The side chains were branched, consisting mainly of  $\alpha$ -L-Araf linked to  $\beta$ -D-Galp, as in structures **3**, **4**, and **5**, and also linked to  $\alpha$ -D-Manp units (**2**). The gum exudate of *Vochysia lehmannii* contained a glycolglucuronomannan with a similar main-chain, but its  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum contained almost exclusively, two C-1 signals at  $\delta$  101.5 and 98.3, arising from the main chain and very small signals from its side chains (Wagner et al., 2004). This contrasts with *V. tucanorum* polymers, whose many side-chain signals of C-1 are prominent (Fig. 3a and b).

Free, reducing oligosaccharides were present in minute quantities and had  $\alpha$ -Araf<sub>4</sub>-Hex<sub>2</sub> (**6**) and Ara<sub>2</sub> structures. Also found was a trace of a hemicellulose-like (1  $\rightarrow$  4)-linked  $\beta$ -D-xylan, which could not be detected in the gum

of *V. lehmannii*. Such oligosaccharides could not be detected in the gum of *V. tucanorum* and suggests a connection between their biosynthesis and that of the glycolglucuronomannan.

The similarity of the structures of free, reducing oligosaccharides to the heteropolysaccharides of gums of *Anadenanthera colubrina* (Delgobo et al., 1998), *Acacia senegal* (Tischer et al., 2002), and others, was used as an aid in determining those of the polysaccharides. In these acidic glycogalactans, the main chain consisted mainly of (1 → 3)-linked β-D-Galp units, substituted at O-6 with a variety of complex side-chains. The free oligosaccharides had similar side-chain structures, except for 6-O-substituted reducing end-units of galactose. If the polysaccharides were biosynthesized via block-type intermediates, simultaneously forming the main and side chains, these reducing ends appeared to be equivalent to the 3,6-di-O-substituted branch points in the main chain of the polysaccharide, the oligosaccharides being byproducts from the intermediates by the action of water. These are primary byproducts, as defined by Kandler & Hopf (1980). Other possibilities could be *in situ* autohydrolysis, or by the action of *endo*- or *exo*-hydrolases, with emphasis on cleavage of the main chain.

In contrast, the mechanism for formation of free, reducing oligosaccharide mixture in the gum of *V. tucanorum* does not belong to any of these categories. Although they contained an arabinose–galactose–mannose sequence, as in 6, with most of its side chain components structurally similar to those of the glycolglucuronomannan, it had a 2-O-substituted mannosyl reducing-end. However, the main chain of the polysaccharide already had Manp 2-O-substituted by GlcpA units. Perhaps, pre-formation of the main chain occurred with subsequent addition of side chains.

To date, the glucuronomannan main-chain has been demonstrated in only a few plant gum exudate polysaccharides, other than native, Brazilian *Vochysia* spp. (Wagner et al., 2004). These are from gum ghatti (*Anogeissus latifolia*; family Combretaceae) (Aspinall, Auret, & Hirst, 1958; Aspinall & Christensen, 1965), occurring in the Indian sub-continent, and *Anogeissus leiocarpus*, occurring in Senegal (Aspinall & Carlyle, 1969; Aspinall, Carlyle, McNab, & Rudowski, 1969; Aspinall & Chaudhari, 1975; Aspinall & McNab, 1969). Species of this genus are of interest in terms of plant systematics and evolution, since one can speculate that a conserved common ancestry existed, considering that the three regions were present in the same land mass, before the occurrence of continental drift(s). In this vein, it would be interesting to search for similar, gum exudate polysaccharides in the Australian sub-continent.

A study is now continuing on the gum exudate of a third local species, *Vochysia thyrsoidea*, to see if the glycolglucuronomannan structure is maintained.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the Brazilian funding agencies CAPES, CNPq, PRONEX-Carbohidratos and Fundação

Araucária, State of Paraná, for financial support, without which this investigation would not have been possible.

## References

- Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., & Ribeiro, J. F. (1998). *Cerrado Espécies Vegetais Úteis Savannah Useful Plant Species*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (pp. 391–395).
- Aspinall, G. O., Auret, B. J., & Hirst, E. L. (1958). Gum ghatti (Indian gum). Part III. Neutral oligosaccharides formed on partial hydrolysis of the gum. *Journal of the Chemical Society*, 4408–4414.
- Aspinall, G. O., & Carlyle, J. J. (1969). *Anogeissus leiocarpus* gum. Part IV. Exterior chains of Leiocarpan A. *Journal of the Chemical Society C*, 851–856.
- Aspinall, G. O., Carlyle, J. J., McNab, J. M., & Rudowski, A. (1969). *Anogeissus leiocarpus* gum. Part II. Fractionation of the gum and partial hydrolysis of Leiocarpan A. *Journal of the Chemical Society C*, 840–845.
- Aspinall, G. O., & Chaudhari, A. S. (1975). Base-catalyzed degradations of carbohydrates. X. Degradation of methylated degraded Leiocarpan A. *Canadian Journal of Chemistry*, 53, 2189–2193.
- Aspinall, G. O., & Christensen, T. B. (1965). Gum ghatti (Indian gum). Part IV. Acidic oligosaccharides from the gum. *Journal of the Chemical Society*, 2673–2676.
- Aspinall, G. O., & McNab, J. M. (1969). *Anogeissus leiocarpus* gum. Part III. Interior chains of Leiocarpan A. *Journal of the Chemical Society C*, 845–851.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1983). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 117, 206–217.
- Delgobo, G. L., Gorin, P. A. J., Jones, C., & Iacomini, M. (1998). The gum heteropolysaccharide and free mono- and oligosaccharides from *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry*, 49, 1207–1214.
- Delgobo, G. L., Gorin, P. A. J., Tischer, C. A., & Iacomini, M. (1999). The free reducing sugars of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudates: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. *Carbohydrate Research*, 260, 167–175.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., Petráková, E., & Hřincovini, M. (1990). Structural features of a water-soluble L-arabino-D-xylan from rye bran. *Carbohydrate Research*, 210, 57–66.
- Filissetti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acid without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157–162.
- Gorin, P. A. J. (1975). Assignment of signals of the carbon-13 magnetic resonance spectrum of a selected polysaccharide: comments on methodology. *Carbohydrate Research*, 37, 3–10.
- Gorin, P. A. J., Horitsu, K., & Spencer, J. F. T. (1965). An exocellular mannan alternately linked 1,3-β and 1,4-β from *Rhodotorula glutinis*. *Canadian Journal of Chemistry*, 43, 950–954.
- Gorin, P. A. J., & Mazurek, M. (1975). Further studies on the assignment of signals in C-13 magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Carbohydrate Research*, 50, 1212–1223.
- Jansson, P.-E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., & Lönngren, J. (1976). *Chemical Communications, University of Stockholm*, 1–76.
- Joseleau, J.-P., Chambat, G., Vignon, M., & Barnoud, F. (1977). Chemical and <sup>13</sup>C NMR studies on two arabinans from the inner bark of *Rosa glauca*. *Carbohydrate Research*, 57, 165–175.
- Kandler, O., & Hopf, H. (1980). Occurrence, metabolism, and function of oligosaccharides. In P. K. Stumpf (Ed.), *The biochemistry of plants, a comprehensive treatise* (Vol. 3, pp. 221–270). New York, NY: Academic Press.
- Maurer-Menestrina, J. M., Sasaki, G. L., Simas, F. F., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2003). Structure of a highly substituted β-xylan from the

- gum exudate of the palm *Livistona chinensis* (Chinese fan). *Carbohydrate Research*, , 1843–1850.
- Menestrina, J. M., Iacomini, M., Jones, C., & Gorin, P. A. J. (1998). Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry*, , 715–721.
- Perlin, A. S., & Casu, B. (1969). Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-1-<sup>13</sup>C. *Tetrahedron Letters*, 2921–2924.
- Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., & Millet, M. A. (1954). Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, , 336–343.
- Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., & Iacomini, M. (2005). Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: some relative activities of hydroxyl groups on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, 0 , 731–739.
- Taylor, R. L., & Conrad, H. E. (1972). Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, , 1383–1388.
- Tischer, C. A., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2002). The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, , 151–158.
- Tischer, C. A., Iacomini, M., & Gorin, P. A. J. (2002). Structure of the arabinogalactan from gum tragacanth (*Astragalus gummifer*). *Carbohydrate Research*, , 1647–1656.
- Tischer, C. A., Iacomini, M., Wagner, R., & Gorin, P. A. J. (2002). New structural features of the polysaccharide from gum ghatti (*Anogeissus latifolia*). *Carbohydrate Research*, , 2205–2210.
- Trevelyan, W. E., Procter, D. P., & Harrison, J. S. (1950). Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, , 444.
- Wagner, R., Woranovicz-Barreira, S. M., Iacomini, M., Delgobo, C. L., Pimentel, N. M., & Gorin, P. A. J. (2004). Structure of a glycolucuronomannan from the low-viscosity gum from *Vochysia lehmannii*. *Carbohydrate Polymers*, 5 , 269–275.
- Whistler, R. L., & Durso, D. F. (1950). Chromatographic separation of sugars on charcoal. *Journal of the American Chemical Society*, , 677–679.

## Accepted Manuscript

A high-viscosity glycoglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia thyrsoidea*. comparison with those of other *Vochysia* spp

Ricardo Wagner, Fernanda F. Simas, Guilherme L. Sasaki, Marcello Iacomini, Maria Aparecida da Silva, Philip A.J. Gorin

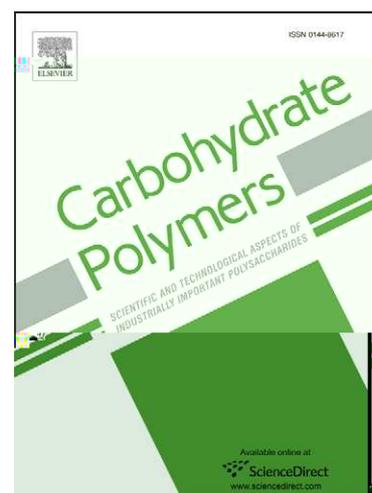
PII: S0144-8617(07)00449-3  
DOI: [10.1016/j.carbpol.2007.09.005](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.005)  
Reference: CARP 3565

To appear in: *Carbohydrate Polymers*

Received Date: 20 April 2007  
Accepted Date: 5 September 2007

Please cite this article as: Wagner, R., Simas, F.F., Sasaki, G.L., Iacomini, M., da Silva, M.A., Gorin, P.A.J., A high-viscosity glycoglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia thyrsoidea*. comparison with those of other *Vochysia* spp, *Carbohydrate Polymers* (2007), doi: [10.1016/j.carbpol.2007.09.005](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.005)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



A high-viscosity glycoglucuronomannan from the gum exudate of  
*Vochysia thyrsoidea*: comparison with those of other *Vochysia* spp.

Ricardo Wagner<sup>a</sup>, Fernanda F. Simas<sup>a</sup>, Guilherme L. Sasaki<sup>a</sup>, Marcello Iacomini<sup>a</sup>,  
Maria Aparecida da Silva<sup>b</sup>, Philip A.J. Gorin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CxP 19046,  
81531-990 Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> RECOR - Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, CxP 08.770,  
70312-970 Brasília, DF, Brazil

---

**Abstract**

The polysaccharide (VTh) extracted with water from the gum exudate of the trunk *Vochysia thyrsoidea* gave a solution of high viscosity and was homogeneous, with  $M_w$   $92.5 \times 10^3$  and  $n_{inh} = 0.212$ . Partial hydrolysis gave a main chain of  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$  repeating groups. Since VTh contained 24% GlcA, neither its monosaccharide ratio (GC-MS of alditol acetates) nor methylation results were accurate. It was therefore carbodiimide-reduced to CR<sub>3</sub>VTh, which contained Ara, Xyl, Man, Gal, and Glc in a molar ratio of 28:4:29:19:25; methylation analysis showed mainly nonreducing end-units of Ara (25%), Ara (8%), and Gal (8%) and side-chain units of 3- (6%) and 3,4-di- (12%) substituted Gal. Main-chain units of Man were 2,3-di- (17%) substituted, showing that they were substituted at O-3 by side chains, but there was less side-chain substitution of Glc units, which were mainly 4- (12%) substituted. Most Ara units in VTh and CR<sub>3</sub>VTh were single nonreducing end-units, and were present in groups of  $\alpha$ -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Man and  $\alpha$ -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man. Other degradation products derived from VTh agreed with this structure. The degree of side-chain substitution of the same main chain was greatest with the gum exudate polysaccharide of *Vochysia utriculata*, and progressively less with those of *Vochysia thyrsoidea*, and *Vochysia leucomann*. High-viscosity aqueous solutions were formed by the gum of *Vochysia thyrsoidea*, in contrast with those of *Vochysia leucomann* and *Vochysia utriculata*.

Keywords: *Vochysia thyrsoidea*; gum glycoglucuronomannan; structure; chemotaxonomy

---

\* Corresponding author. tel.: +55-41-3361-1670; fax: +55-41-3266-2042

E-mail address: [cesarat@ufpr.br](mailto:cesarat@ufpr.br) (P.A.J. Gorin)

## 1. Introduction

Trees of the family Vochysiaceae are common in the sub-tropical and tropical regions of Brazil, often occurring in the transition zone between the savannah and Atlantic forest. Wagner et al. (2004) showed that the gum exudate, growing on the trunk of *Vochysia lehmannii*, contained a polysaccharide with a repeating  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$  group as its main chain, which was lightly *O*-substituted with complex side-chains. The gum polysaccharide from *Vochysia tucanorum* has a similar main-chain, but with a much higher degree of *O*-substitution (Wagner et al, 2007, in press). These structures are represented by their  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, that of *V. lehmannii* having predominant C-1 signals at  $\delta$  98.3 and 101.6 arising from the main chain (Fig. 1A). These were not evident in those of *V. tucanorum*, which were mostly from side-chains (Fig. 1B), while those of the main chain were only revealed on partial hydrolysis. We now investigate the glycolglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia thyrsoidea*, which has been described by Almeida et al. (1998). Its C-1 signals (Fig. 1C) indicated an intermediate degree of side-chain substitution

## 2. Experimental

### 2.1. *Vochysia thyrsoidea* gum

The gum was collected during January 2005 from the trunk of a tree growing in the Ecological Reserve (RECOR) of the Brazilian Institute of Geography and Statistics, an affiliate of the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE).

This is situated in a sub-tropical location 35 km to the south of the capital Brasília, in a region subject to frequent fires and dry periods, contributing to periodic tree stress.

### 2.2. Preparation of gum polysaccharide (VTh)

A sample of the original, dry gum was cleaned to remove manually charcoal arising from fires. A sample (110 g) dissolved almost completely in H<sub>2</sub>O (1.0 L), and the viscous solution was evaporated to 450 mL, insoluble particles centrifuged off, and the supernatant added to EtOH (x 3). The precipitated polysaccharide was dissolved in H<sub>2</sub>O and the solution was dialyzed with a membrane having pores of 12000-14000, and then freeze-dried to give VTh (57 g).

### 2.3. Analytical methods

#### 2.3.1. M n a c c a e c n t n l y a c c a e

The uronic acid contents of polysaccharides (1.0 mg) were determined using an *m*-hydroxydiphenyl colorimetric method, with which neutral, reducing sugars do not interfere (Filisetti-Cozzi, & Carpita, 1991).

Samples (1.0 mg) were hydrolyzed with 2M TFA for 8 h at 100 °C, and the products were reduced with NaBD<sub>4</sub> (Wolfrom, & Thompson, 1963a) to give alditols, which were acetylated with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (Wolfrom, & Thompson, 1963b). The resulting alditol

(30 m x 0.25 mm i.d.), programmed from 50 °C (1 min) at 40 °C/min to 220 °C (then hold), with He as carrier gas.

The hydrolyzate of VTh was examined by silica gel TLC (solvent: *n*-PrOH-EtOAc-HOAc-H<sub>2</sub>O, 2:4:2:1, spray: orcinol), to detect glucuronolactone with  $R_F$  0.83. The mixture was treated with 0.5% aq. NaHCO<sub>3</sub> for 18 h at 25 °C to convert it to Na glucuronate, which does not afford glucitol on NaBD<sub>4</sub> reduction.

### 2.3.2. Size analysis

The molecular weight distribution of VTh was determined using Wyatt Technology equipment incorporating ultrahydrogel columns 2000, 500, 250, and 120, connected to a differential refractometer (model 2410, Waters) and a laser light scattering detector, at 632.8 nm (Dawn DSPF model). The eluant was aq. 0.1M NaNO<sub>2</sub> + 0.2 g/L NaN<sub>3</sub>, at a flow rate of 0.6 mL/min. The samples were dissolved in aq. NaNO<sub>2</sub> (1 mg/mL) and filtered through a cellulose membrane with an average pore diameter of 0.2 µm: a volume of 100 µL was injected into the apparatus. Results were provided directly with the aid of ASTRA 4.70.07 computer software.

### 2.3.3. Methylation analysis by acetylation

Samples of polysaccharide (25 mg), when not soluble in Me<sub>2</sub>SO, were partially - methylated by the method of Haworth (1915), using Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/aq. NaOH, which rendered the product Me<sub>2</sub>SO-soluble, and which was then per- -methylated with the Me<sub>2</sub>SO-MeI-NaOH method of Ciucanu, & Kerek (1984).

The products were then partially hydrolyzed with 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v, 1 mL) for 1 h at 4 °C (Saeman, Moore, Mitchell, & Millet, 1954), after which the solution was diluted to 1M and maintained for 16 h at 100 °C for complete hydrolysis. The solutions were neutralized (BaCO<sub>3</sub>), filtered, and the filtrates evaporated to residues of partially methylated aldoses, which were converted to their corresponding mono-deuterated

#### 2.4. Polysaccharides derived from VTh

##### 2.4.1. Partial hydrolysis of VTh to obtain (Ph-VTh)

VTh (2.00 g) was partially hydrolyzed with 0.5M TFA (300 mL) at 100 °C for 4 h and the solution then evaporated to 100 mL, which was added to EtOH (x 3) to give a precipitate (0.67 g) of the main chain (Ph-VTh).

##### 2.4.2. Carboxy-reduction

VTh (2.00 g) was submitted to three carboxy-reduction cycles, each according to Taylor, & Conrad (1972), to give CR<sub>3</sub>VTh (1.56 g). A single carboxy-reduction of Ph-VTh (200 mg) gave rise to Ph-VTh-CR (168 mg).

##### 2.4.3. Controlled Smith degradation of CR<sub>3</sub>VTh to S<sub>1</sub>CR<sub>3</sub>VTh

A controlled Smith degradation of CR<sub>3</sub>VTh (880 mg) to give S<sub>1</sub>CR<sub>3</sub>VTh (126 mg) was carried out by successive NaIO<sub>4</sub> oxidation, NaBH<sub>4</sub> reduction, and partial hydrolysis to polysaccharide (Wagner et al., 2004).

### 3. Res

*tucanorum* (Wagner et al., 2007 in press), whose solutions were not viscous. Precipitation with excess ethanol provided polysaccharide (VTh; 52% yield), which was homogeneous on HPSEC with  $M_w$   $92.5 \times 10^3$  and  $dn/dc = 0.212$  (Fig. 2), and was completely precipitated with Cetavlon at pH 7.0. VTh gave a  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (Fig. 1C) showing an intermediate degree of side-chain substitution, when compared with polysaccharides of *V. lehmannii* (Fig. 1A) and *V. tucanorum* (Fig. 1B).

The ethanol supernatant from the above contained monosaccharides, mainly arabinose, but no free, reducing oligosaccharides were detected.

### 3.2. Preparation of polysaccharide fractions from VTh

VTh was subjected to a series of degradations necessary for its structural analysis (Fig. 3)

Partial hydrolysis revealed its main chain (Ph-VTh), and which was carboxy-reduced to form fraction Ph-VTh-CR.

Three successive carboxy-reductions of VTh using carbodiimide converted it to CR<sub>3</sub>VTh, most of its GlcA being converted to Glc units. The product was subjected to a controlled Smith degradation providing S<sub>1</sub>CR<sub>3</sub>VTh.

### 3.3. Analysis of polysaccharide fractions

#### 3.3.1. Analysis of polysaccharide VTh

VTh contained 24% uronic acid, determined colorimetrically, but the ratio of 48:3:10:10:4 for Ara, Xyl, Man, Gal, and Glc (Table 1), obtained by GC-MS of alditol acetates, derived from the acid hydrolyzate, is inaccurate with a low mannose content, due to the resistance of resulting  $\beta$ -D-Glc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man. Furthermore, any liberated glucuronic acid would be partially converted to glucuronolactone, which would be reduced to glucose on NaBD<sub>4</sub> reduction, as

main chain of  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$  repeating groups (Wagner et al., 2007 in press).

Ph-VTh was carboxy-reduced to give Ph-VTh-CR (65% yield), which contained Man, Gal, and Glc in a molar ratio of 51:5:44 (Table 1). Methylation analysis showed the presence of 2-*O*-substituted Manp (48%) and 4-*O*-substituted Glcp units (32%) (Table 2). Its  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum contained 12 main signals (Fig. 4B), consistent with a  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$  repeating group.

### 3.3.3. Analysis of carboxy-reduced CR<sub>3</sub>VTh

For an accurate characterization of VTh, which was prejudiced by the presence of glucuronic acid, it was converted by three successive carboxy-reductions to CR<sub>3</sub>VTh (93% yield), which contained only 4% uronic acid (Table 1). Its monosaccharides were Ara, Xyl, Man, Gal, and Glc in a 28:4:29:10:25 molar ratio (GC-MS of derived alditol acetates).

Methylation analysis of CR<sub>3</sub>VTh (Table 2), in which GlcpA of VTh were reduced to Glcp units, indicated mainly nonreducing end-units of Araf (25%) and Arap (8%), nonreducing end- (8%) and 3,4-di-*O*-substituted Galp units (12%), and 2,3-di-*O*-substituted Manp (17%) and 4-*O*-substituted Glcp (12%) from its main chain.

The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of CR<sub>3</sub>VTh was complex, as expected, with 5  $\alpha$ -L-Araf signals in the C-1 region at  $\delta$  106.3 to 109.2 (Fig. 5A).

A controlled Smith degradation of CR<sub>3</sub>VTh formed S<sub>1</sub>CR<sub>3</sub>VTh (21% yield), which contained Ara, Man, Gal, Glc, and uronic acid in a 5:47:9:34:5 molar ratio (Table 1). Most of the arabinose-containing nonreducing end-units were thus removed, confirmed by methylation analysis, and of which only 2% remained

(Table 2). Principal components were nonreducing end- (5%) and 3-*O*-substituted Galp (14%), as well as main-chain components of 2-*O*- (34%) and 2,3-di-*O*-substituted Manp (12%), and 4-*O*-substituted Glcp units (20%). The <sup>13</sup>C NMR spectrum of S<sub>1</sub>CR<sub>3</sub>VT (Fig. 5B) contained mainly C-1 signals of the main chain at δ 99.4 and 101.5, with 6 minor ones, including an α-L-Araf signal at δ 109.0. This indicated that the side chains contained internal Galp *O*-substituted by single-unit Ara<sup>f</sup> units to form branches, similar to those occurring in the glycolglucuronomannan of the gum exudate isolated from *V. tucanorum* (Wagner et al, 2007 in press).

#### 4. Discussion

The polysaccharide VTh from the gum of *V. tucanorum* differed from those from *V. lemannii* and *V. thyrsoidea*, as it dissolved completely in water, had a high viscosity, and was homogeneous on HPSEC. Each polysaccharide contained a main chain of →4)-β-D-GlcA-(1→2)-α-D-Manp-(1→ repeating groups, although they were substituted by side chains in the order *V. tucanorum* > *V. thyrsoidea* > *V. lemannii*, as evidenced by their respective <sup>13</sup>C NMR spectra (Figs. 1B, 1C, and 1A respectively) and other data.

Although detailed structural analyses were carried out on VTh and derived polysaccharides, an emphasis was placed on carbdiimide-reduced CR<sub>3</sub>VTh, which contained only 4% of GlcA units, as compared with the 24% in VTh, prejudicial in determining monosaccharide ratios and methylation-GC-MS analysis. CR<sub>3</sub>VTh contained Ara, Xyl, Man, Gal, Glc, and GlcA in a 28:4:29:10:25:4 molar ratio

(Table 1) mainly with side-chain units of nonreducing ends of *Araf* (25%), *Arap* (8%), and *Galp* (8%), and internal 3-*O*- (6%), and 3,4-di-*O*-substituted *Galp* units (12%). The main-chain units were 2,3-di-*O*-substituted *Manp* (17%), showing considerable side-chain substitution at O-3, in contrast with 4-*O*-substituted *GlcP* (12%) derived from original *GlcPA* units. Only 4% of the *GlcP* units were 3-*O*-substituted by side chains (Table 2).

The side chains of CR<sub>3</sub>VTh were susceptible to a controlled Smith degradation with a survival of only 5% Ara (Table 1) and those of *Galp* were principally nonreducing ends (5%) and 3-*O*-substituted units (14%). Most of the surviving *GlcP* units were 4-*O*- (12%) and those of *Manp* were 2-*O*- (34%) and 2,3-di-*O*-substituted (12%), still with side chains at O-3.

nn Thh2oo2(r)-0.699594( )-0107220( )-0.3 11.2(d)-0.801(

of the ornamental South American silk floss tree, *Bombyx mori* St. Hil., family *Bombycidae*, has a similar main chain and related side-chain structures. Only a few similar gum polysaccharides have so far been found, namely those isolated from gum ghatti (*Acacia ghatti*) from India and *Acacia senegal* from Senegal. A possible chemotaxonomic significance, based on the continent of origin, has been raised (Wagner et al., 2007 in press).

It may be significant that other similar, branched glycolucurononmannans have American origins, such as those isolated from cell cultures of tobacco (*Nicotiana glauca*; Mori, & Katō, 1981) and tuberose (*Platystemon oviforme*), a flowering plant native to Mexico (Honda et al., 1996).

R

- Mori, M., & Katō, K. (1981). An arabinoglucuronomannan from suspension-cultured calls of *Crotalaria retusa*. *Carbohydrate Research*, *9*, 49-58.
- Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., & Millet, M. A. (1954). Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Technical Association of Paper Mill Chemists*, *37*, 336-343.
- Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., & Iacomini, M. (2005). Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, *30*, 731-739.
- Taylor, R. L., & Conrad, H. E. (1972). Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biotechnology*, *1*, 1383-1388.
- Wagner, R., Woranovicz-Barreira, S. M., Iacomini, M., Delgobo, C. L., Pimentel, N. M., & Gorin, P. A. J. (2004). Structure of a glycolucuronomannan from the low-viscosity gum from *Vicia lemniscata*. *Carbohydrate Research*, *57*, 269-275.
- Wagner, R., Simas, F. F., Pereira, C. G. Z., Angeli, A., Brito, J. O., Woranowicz-Barreira, S. M., Delgobo, C. L., Sasaki, G. L., Iacomini, M., & Gorin, P. A. J. (2007). Structure of a glycolucuronomannan from the gum exudate of *Vicia utcanu* (family Vochysiaceae), *Carbohydrate Polymers*, in press.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride. *Metabolism*, *2*, 65-68.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963b). Acetylation. *Metabolism*, *2*, 211-215.

### Figure legends

Fig. 1. C-1 regions of  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of polysaccharides from gum exudates of *V. lehmannii* (A), *V. tucanorum* (B), and *V. thyrsoidea* (C)

Fig. 2. HPSEC of gum polysaccharide of *V. thyrsoidea* (VTh), using a refractive index detector

Fig. 3. Scheme of products derived from gum polysaccharide of *V. thyrsoidea* (VTh)

Fig. 4.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of glucuronomannan (Ph-VTh; A) obtained on partial hydrolysis of the gum polysaccharide of *V. thyrsoidea* (VTh) and glucomannan (Ph-VTh-CR; B) obtained on carboxy-reduction of Ph-VTh

Fig. 5.  $^{13}\text{C}$  spectra of product ( $\text{CR}_3\text{VTh}$ ; A) obtained by carboxy-reduction of the gum polysaccharide of *V. thyrsoidea* (VTh) and that from a controlled Smith degradation ( $\text{S}_1\text{CR}_3\text{VTh}$ ; B) of  $\text{CR}_3\text{VTh}$

Table 1.

Monosaccharide composition of fractions obtained from gum of *V. t. y. ea*

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 2.  
Methylation analysis fractions from *VTh*  $\alpha$ : partially -methylated, neutral alditol acetates  
obtained from per- -methylated fractions

OMe alditol acetate <sup>b</sup>	$k_i^c$	VTh	% of total fragment area <sup>a</sup>			
			Ph-VTh	Ph-VTh-CR	CR <sub>3</sub> VTh	S <sub>1</sub> CR <sub>3</sub> VTh
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	0.81	23	2	1	25	2
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara	0.83	3	-	-	8	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	0.85	3	-	-	4	-
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	0.96	1	-	-	-	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.99	-	3	4	-	3
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	-	2	4	-	1
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Gal	1.05	8	4	2	8	5
5-Me-Ara	1.13	2	-	-	1	1
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.28	5	76	48	3	34
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.35	4	1	5	6	14
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.37	-	-	32	12	20
4,6-Me <sub>2</sub> -Man	1.63	38	10	4	17	12
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1.70	10	-	-	12	3
2,6-Me <sub>2</sub> Glc	1.75	-	-	-	4	3
2-Me-Gal	2.60	3	-	-	-	2

<sup>a</sup> % relative to total peak area; values < 1% not included

<sup>b</sup> -Methyl alditol acetates analyzed by GC-MS.

<sup>c</sup> Retention time compared with that of 2,3,4,6-tetra- -methylglucitol acetate

ACCEPTED MANUSCRIPT

Fig. 2. HPSEC of gum polysaccharide of *V. thyrsoidea* (VTh), using a refractive index detector

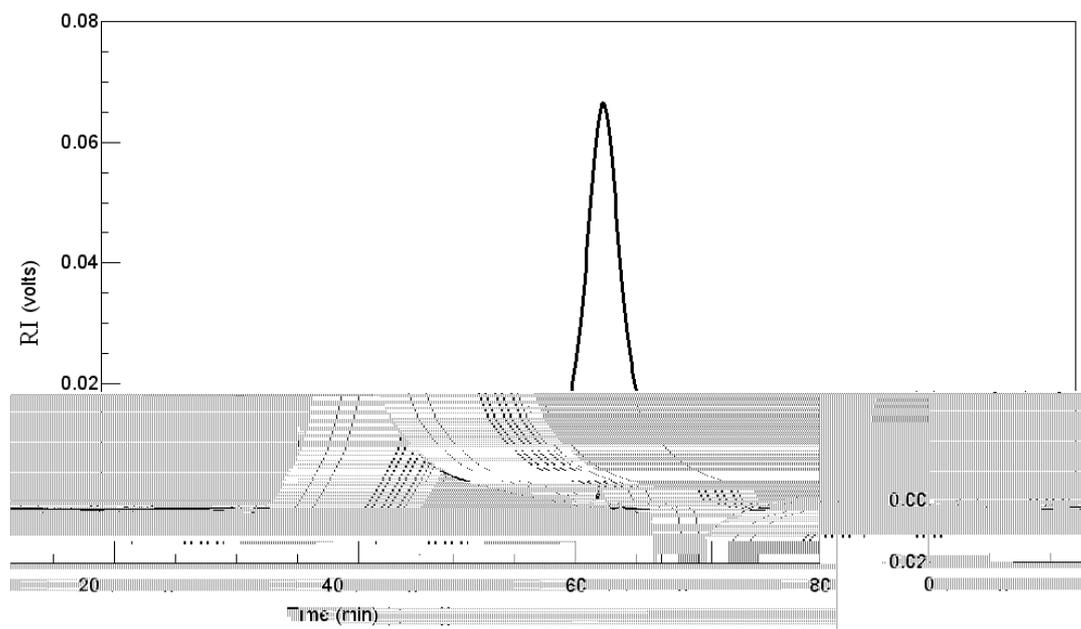


Fig. 3. Scheme of products derived from gum polysaccharide of *V. thyrsoidea* (VTh)

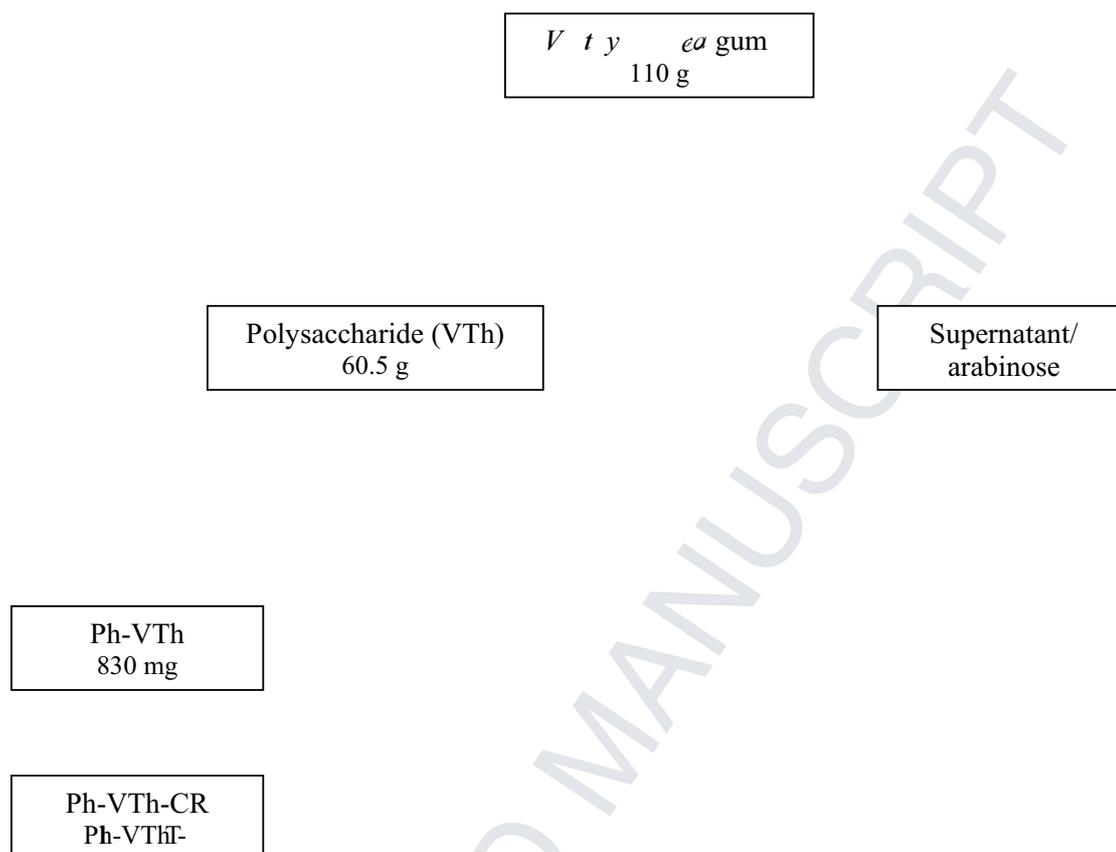


Fig. 4.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of glucuronomannan (Ph-VTh; A) obtained on partial hydrolysis of the gum polysaccharide of *V. thyrsoidea* (VTh) and glucomannan (Ph-VTh-CR; B) obtained on carboxy-reduction of Ph-VTh

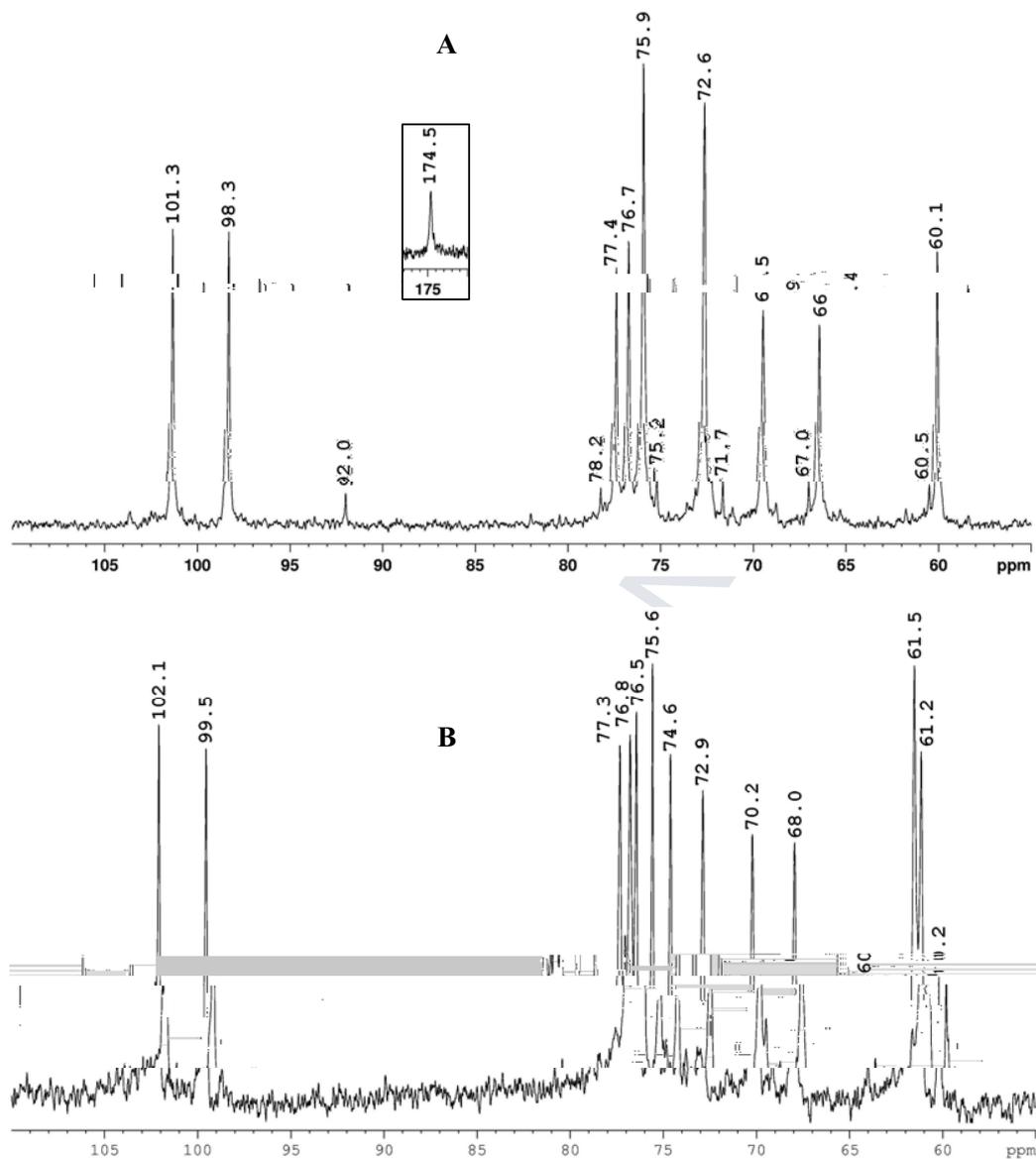
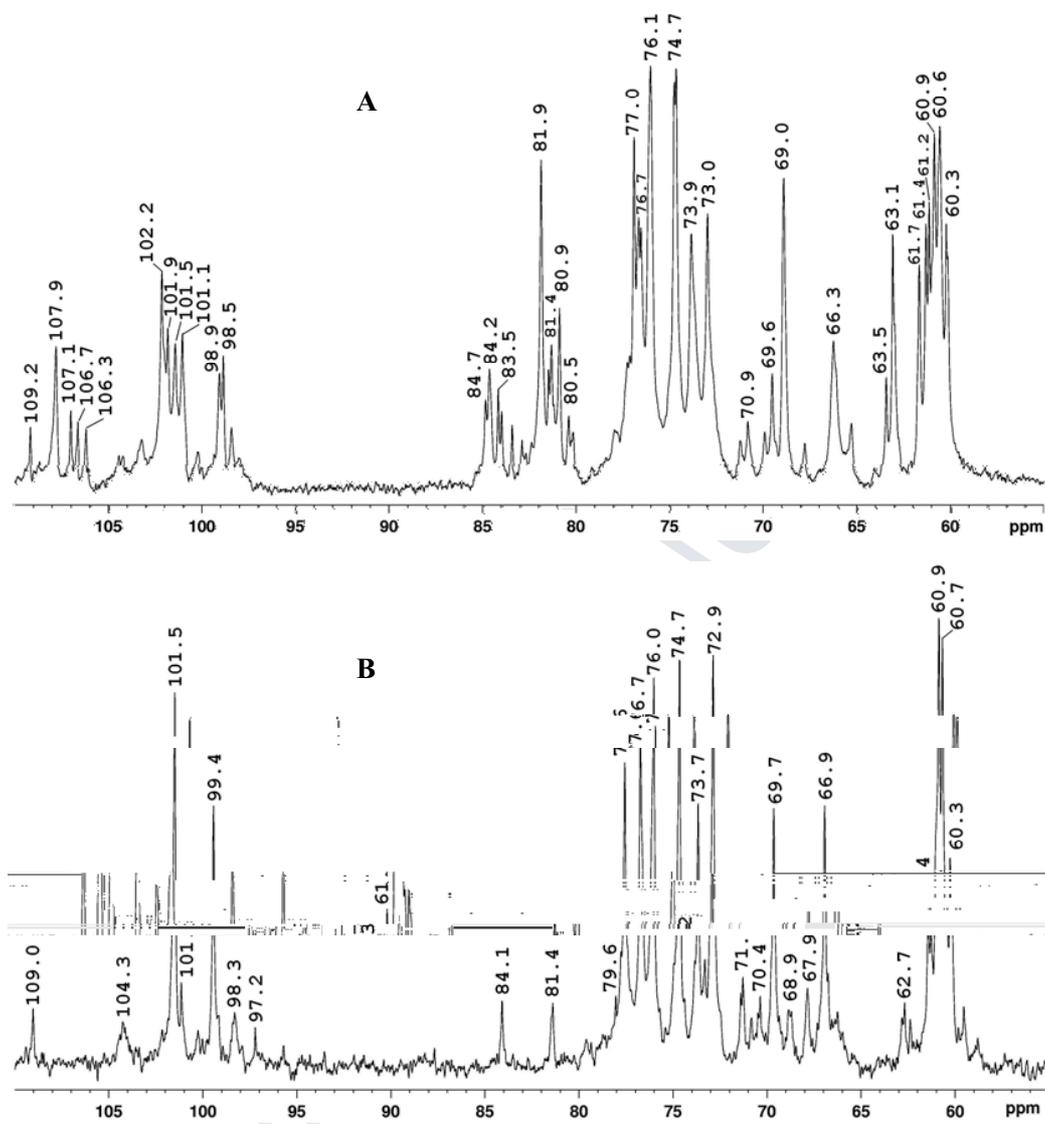


Fig. 5.  $^{13}\text{C}$  spectra of product ( $\text{CR}_3\text{VTh}$ ; A) obtained by carboxy-reduction of the gum polysaccharide of *V. thyrsoidea* (VTh) and that from a controlled Smith degradation ( $\text{S}_1\text{CR}_3\text{VTh}$ ; B) of  $\text{CR}_3\text{VTh}$



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)