

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS PÉCTICOS DA PÊRA PASSA DE VISEU

Lisete Silva, Cláudia Nunes, Maria do Rosário Domingues, Raquel Guiné, Manuel António Coimbra

RESUMO

Os polissacarídeos pécticos integram uma grande família de polissacarídeos constituídos, essencialmente, por uma longa cadeia de resíduos de ácido galacturónico (GalA). Estes compostos podem ser encontrados nas paredes celulares primárias dos frutos e vegetais, apresentando um papel importante na determinação da força e flexibilidade dos tecidos.

Os polissacarídeos das paredes celulares da pêra de S. Bartolomeu obtida em fresco e das peras secadas foram fraccionados e caracterizados quanto à sua constituição em açúcares. Algumas fracções ricas em polissacarídeos pécticos foram seleccionadas para uma análise estrutural mais detalhada, nomeadamente o sobrenadante do resíduo celulósico da pêra fresca (SnCR). Estes polissacarídeos pécticos foram hidrolisados com uma *endo*-poligalacturonase (PG), uma hidrolase específica para os resíduos de ácido poligalacturónico em ligação α -(1→4). Os oligossacarídeos obtidos foram separados por tamanho utilizando uma cromatografia de exclusão molecular. As fracções de menor peso molecular foram analisadas por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS e ESI-MS/MS).

Para comparação das características estruturais dos polissacarídeos das peras com a de outros frutos, estudou-se ainda uma pectina comercial proveniente de citrinos.

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos pécticos estão presentes em elevadas quantidades nos frutos e são das suas características nas diferentes fases do seu crescimento, amadurecimento e processamento. Os

polissacarídeos pécticos têm muitas funções nas paredes celulares dos tecidos, sendo determinantes para a sua robustez e flexibilidade.

Os polissacarídeos pécticos representam um grupo complexo de polissacarídeos que têm como cadeia principal resíduos de ácido galacturónico (GalA) em ligação α -(1→4). Na parede celular podem existir quatro tipos de polissacarídeos pécticos, denominados da seguinte forma: homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I), que incluem as cadeias de arabinogalactanas e arabinanas, ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) e as xilogalacturonanas (XGA). As HG são polímeros lineares, constituídos por resíduos de α -(1→4)-D-GalpA, [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1→]_n, que podem estar parcialmente metilesterificados e/ou acetilados em O-2 e/ou O-3. As RG-I são constituídas, na cadeia principal, de unidades repetidas de [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1→2)- α -L-Rhap-(1→], que podem estar ramificadas em O-4 nos resíduos de Rha, com cadeias laterais constituídas por resíduos de galactose (Gal) e/ou arabinose (Ara). As RG-II estão descritas como sendo heteropolissacarídeos complexos, que contêm uma cadeia principal de HG. São ainda constituídos por cadeias de, pelo menos, 8 resíduos de α -D-GalpA, em ligação (1→4), onde estão directamente ligadas quatro cadeias de oligossacarídeos contendo açúcares pouco comuns, como a apiose, o ácido acérico, ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico (DHA) e o ácido 3-desoxi-D-mano-2-actulosónico (KDO) (Vidal et al., 2000).

Os constituintes principais das paredes celulares da polpa da pêra de S. Bartolomeu são os polissacarídeos pécticos (36%), a celulose (31%) e as glucuronoxilanas (27%), e os componentes minoritários são as xiloglucanas (4%) e as mananas (2%) (Ferreira, 2003).

Neste trabalho, foram determinadas as características estruturais detalhadas dos polissacarídeos pécticos da pêra de S. Bartolomeu e de uma pectina comercial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS:

Neste trabalho foram utilizados extractos obtidos no fraccionamento dos polissacarídeos da parede celular da pêra fresca e secada:

Na₂CO₃-f: amostra de pêra fresca extraída com Na₂CO₃

Na₂CO₃-s: amostra de pêra secada extraída com Na₂CO₃

CDTA-f: amostra de pêra fresca extraída com CDTA (agente quelante)

CDTA-s: amostra de pêra secada extraída com CDTA

Sn-CR-f: sobrenadante do resíduo celulósico da pêra fresca

A pectina comercial proveniente de citrinos também foi usada neste trabalho.

ANÁLISE DE AÇÚCARES:

Os polissacarídeos pécticos das diferentes amostras foram hidrolisados e os açúcares neutros resultantes foram reduzidos e acetilados. A detecção e quantificação dos diferentes açúcares foram efectuadas com recurso à cromatografia em fase gasosa utilizando um detector de ionização de chama (GC-FID) (Coimbra *et al.*, 1996). A determinação dos ácidos urónicos foi feita por colorimetria utilizando como reagente o *m*-fenilfenol em ácido sulfúrico concentrado (Coimbra *et al.*, 1996).

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA:

Todas as amostras foram sujeitas a uma hidrólise enzimática selectiva com PG. A hidrólise foi realizada com uma solução tampão de acetato de sódio 0,1 M, durante 1 h a 26°C. Deste modo, foram obtidos oligossacarídeos pécticos, que posteriormente foram separados por cromatografia de exclusão molecular.

CROMATOLOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR:

A cromatografia de exclusão molecular foi efectuada em colunas de Biogel P2 e P6, que permitem fraccionar moléculas com tamanhos que variam de 100-1800 e 1000-6000 Da, respectivamente. Esta técnica permitiu a separação por tamanho dos oligossacarídeos pécticos resultantes da hidrólise com PG. Na tabela 1 são descritas as condições de eluição utilizadas para as diferentes amostras.

Tabela 1: Condições de eluição da cromatografia de exclusão molecular para as diferentes amostras.

Amostra	Biogel	Eluente	Fluxo (mL/min)
Na ₂ CO ₃ -s	P6	H ₂ O destilada	0,30
		Tampão fosfato 50mM pH=6,5	0,70
Na ₂ CO ₃ -f	P6	H ₂ O destilada	0,30
CDTA-f antes e após saponificação	P6	H ₂ O destilada	0,53
CDTA-s	P6	H ₂ O destilada	0,53
Sn-CR-f	P6	H ₂ O destilada	0,53
PC	P6	H ₂ O destilada	0,53
		Tampão fosfato 50mM pH=6,5	0,70
	P2	H ₂ O destilada	0,55
		H ₂ O destilada pH=2,7	0,56

Às fracções resultantes da cromatografia de exclusão molecular, realizaram-se testes colorimétricos para a detecção dos açúcares e dos ácidos urónicos (GalA).

ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (ESI-MS):

As fracções de menor peso molecular onde foram detectados açúcares e ácidos urónicos foram analisadas por espectrometria de massa (MS) utilizando o método de ionização por electrospray (ESI), operando em modo positivo, utilizando um fluxo de 10 µL/min.

DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ESTERIFICAÇÃO E ACETILAÇÃO:

Os polissacarídeos pécnicos podem encontrar-se metilesterificados e/ou acetilados, impedindo a acção da PG. O grau de metilesterificação e de acetilação foi obtido com recurso à microextracção em fase sólida (SPME). As amostras foram saponificadas com uma solução de NaOH e, após acidificação com HCl, o metanol e o ácido acético resultantes foram adsorvidos na fibra de 208

SPME (DVB/Carboxen/PDMS) e a quantificação é feita por GC-FID (Nunes *et al.*, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 pode ser observado, como exemplo, o resultado da análise de açúcares para um extracto obtido no fraccionamento dos polissacarídeos da pêra fresca (SN-CR-f) e para a pectina comercial (PC).

Tabela 2: Concentração, em % mol, dos açúcares presentes nas amostras de Na₂CO₃-s e PC

Amostra	% mol							Açúcares totais
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU	(mg/g)
Sn-CR-f	-	44	12	-	19	3	21	264
PC	1	1	-	1	3	13	81	1016

Rha-ramnose; Ara-arabinose; Xyl-xilose; Man-manose; Gal-galactose; Glc-glucose; AU-ácidos urónicos; v- quantidade vestigial;.

No que respeita à análise efectuada aos açúcares presentes nas amostras de Sn-CR-f e PC, pode dizer-se que esta última é, essencialmente, constituída por ácidos urónicos (81 % mol). No entanto, apresenta ainda uma quantidade considerável de Glc (13 % mol). No caso da amostra de Sn-CR-f, a Ara é o açúcar mais abundante (44 % mol). No entanto, os ácidos urónicos (21 % mol), assim como a Gal (19 % mol), assumem um grande peso na quantidade de açúcares totais.

O método de eluição das amostras na cromatografia de exclusão molecular teve de ser optimizado. Como se pode observar na tabela 1, testaram-se diferentes eluentes como a água destilada (pH~7), uma solução tampão fosfato 50 mM (pH=6,5) e água destilada acidificada (pH=2,7). A utilização de um pH mais ácido permite que os resíduos de GalA se encontrem protonados, tendo-se verificado que, neste caso, as interacções dos compostos com a fase estacionária eram minimizadas. Optou-se pela utilização do Biogel P2 e como eluente água acidificada pois permitiu uma separação mais eficaz dos oligossacarídeos pécticos.

Nas amostras possuindo maior quantidade de resíduos de Ara e Gal foi mais difícil a obtenção de oligossacarídeos pécticos. A presença

de grupos metilo e acetilo também impedem a hidrólise. A amostra CDTA-f, por exemplo, como tinha um índice de metilação de 23-41%, houve necessidade de se proceder à saponificação das amostras para que fossem removidos os grupos metilo, seguida de nova cromatografia de exclusão molecular.

Os cromatogramas obtidos, para todas as amostras analisadas, apresentavam dois picos, um pico na zona do limite de exclusão da coluna (> 1800 ou 6000 Da) e o outro correspondente a moléculas de baixo peso molecular, como se pode observar na figura 1.

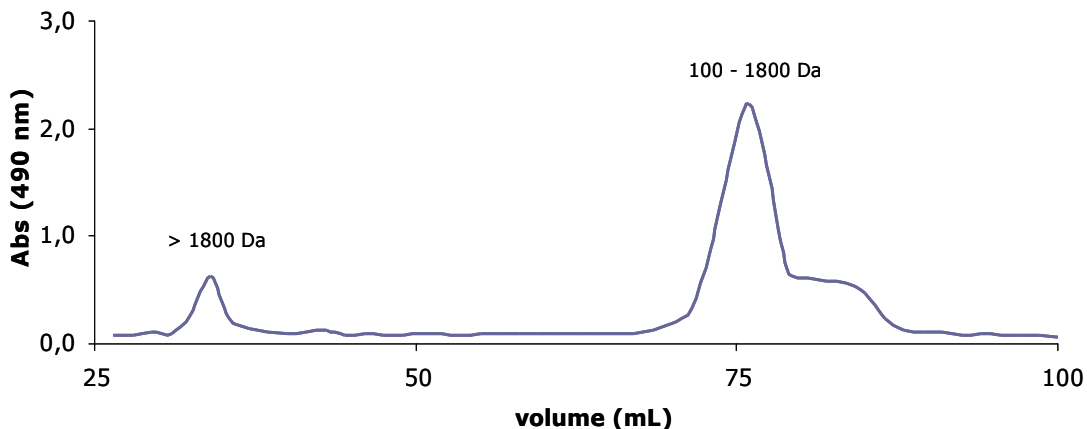


Figura 1 – Cromatograma da pectina comercial após a hidrólise com a PG, eluída com água destilada acidificada numa coluna de Biogel P2.

As fracções de menor peso molecular, que eluíram no pico de maior tempo de retenção, foram analisadas por espectrometria de massa (MS) utilizando o método de ionização por electrospray (ESI). A identificação das características estruturais destes oligossacarídeos, nomeadamente a sua composição em açúcares, sua sequência e possíveis ramificações foram determinadas pela análise dos dados de ESI-MS/MS dos iões identificados nos espectros de ESI-MS.

Através interpretação detalhada dos espectros de ESI-MS, foi possível detectar a presença de uma série de oligossacarídeos que se apresentam sob a forma de aductos de sódio, $[M+Na]^+$. Na tabela 3 são apresentados os resultados do conjunto de todas as fracções analisadas para duas das amostras (Sn-CR-f e PC), com a indicação dos valores de m/z dos iões mais abundantes observados em ESI-MS, com a possível identificação.

Tabela 3: Iões observados nos espectros de ESI-MS para as fracções analisadas de polissacarídeos pécticos da amostra Sn-CR-f e da PC, indicando os valores de m/z para os respectivos iões $[M+Na]^+$, e a sua possível identificação.

$GalA_nHex_mPent_p$	n	m	p	<i>Polissacarídeos pécticos</i>	
				<i>PC</i>	<i>Sn-Cr-f</i>
GalA_n	1	0	0	217	-
	2	0	0	393	-
	3	0	0	569	-
	4	0	0	745	745
GalA_nHex_m	2	1	0	555	-
	3	1	0	731	731
	4	1	0	-	907
GalA_nPent_p	2	0	1	525	-
	3	0	1	701	701

Os valores de m/z observados, em conjunto com os dados de análise de açúcares (tabela 1), permitiram atribuir diferentes estruturas para os oligossacarídeos. Estas pertencem a três séries distintas: oligossacarídeos constituídos apenas por resíduos de ácido galacturónico ($GalA_n$, $n=1-4$), resíduos de ácido galacturónico substituídos por resíduos de pentoses ($GalA_nPent$, $n=2-3$) e resíduos de ácido galacturónico substituídos por resíduos de hexoses ($GalA_nHex$, $n=2-4$).

Na figura 2 é apresentado um espectro de ESI-MS/MS, como exemplo dos espectros obtidos para a série $GalA_n$, do ião m/z 745. Neste espectro observam-se três perdas consecutivas de um resíduo de GalA (-176 Da), originando após a primeira perda um ião com m/z 569, depois um ião com m/z 393 e por último a formação de uma ião m/z 217, correspondente ao aducto de sódio $[GalA+Na]^+$. Deste modo, podemos confirmar a estrutura atribuída ao ião m/z 745 como sendo um tetrassacarídeo de GalA, pertencente à cadeia linear dos polissacarídeos pécticos (homogalacturonanas).

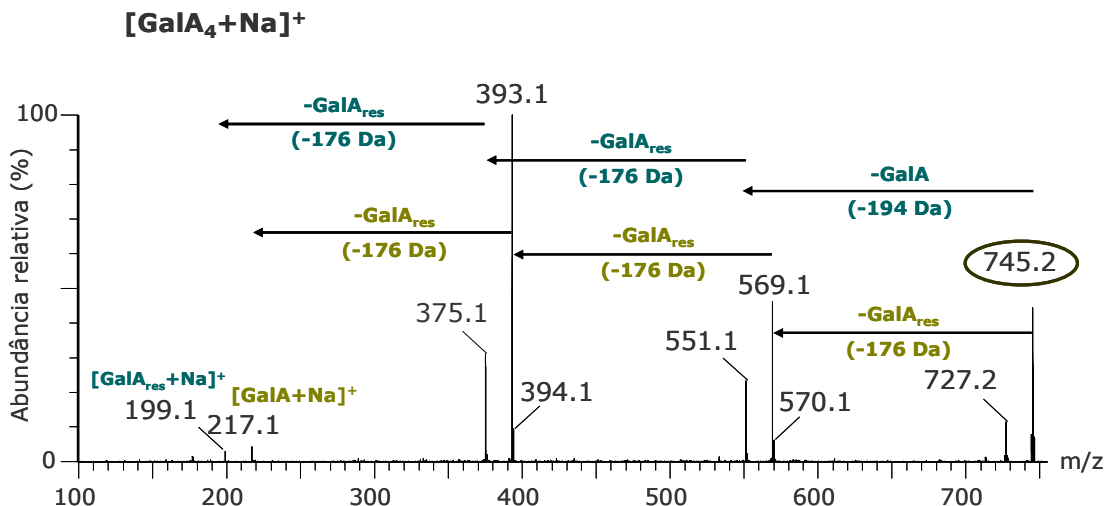


Figura 2 – Espectros de ESI-MS/MS relativo ao ião m/z 745.

O espectro de ESI-MS/MS do ião m/z 701, que representa a série GalA_nPent, é apresentado na figura 3. Pela análise da principal via de fragmentação deste ião (formado por um resíduo de pentose e três resíduos de ácido galacturónico), permite observar uma primeira perda de -194 Da, que corresponde a uma molécula de GalA (176+18) com formação do ião m/z 507. Este perde um resíduo de pentose (-132 Da) dando origem ao ião m/z 375, que por sua vez perde ainda um resíduo de GalA (-176 Da), obtendo-se um aducto de sódio formado por [GalA_{res}+Na]⁺.

Os oligossacarídeos desta série, constituídos por resíduos de ácido galacturónico ligados a pentoses, são provavelmente provenientes das xilogalacturonanas.

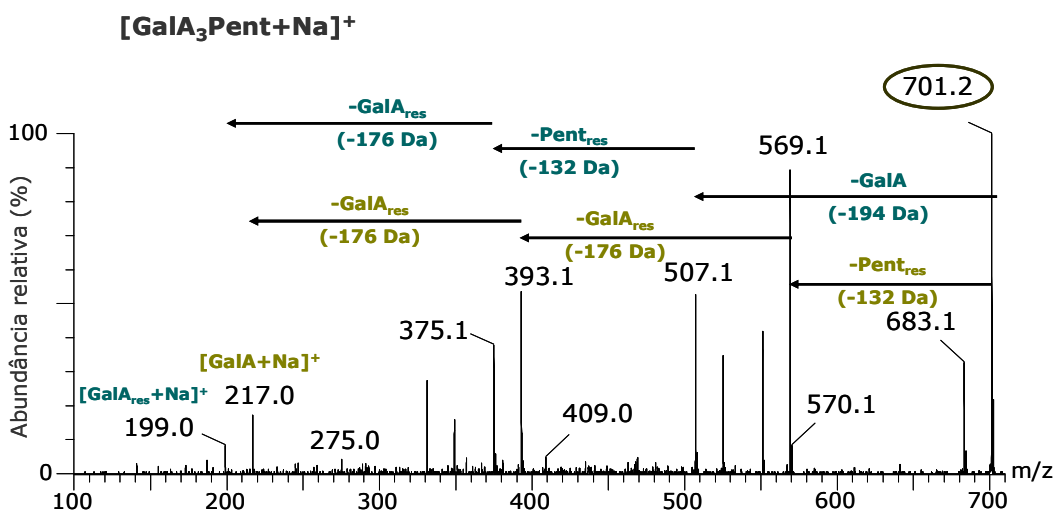


Figura 3 – Espectros de ESI-MS/MS relativo ao ião m/z 701.

O espectro MS/MS do ião m/z 731, como exemplo da fragmentação obtida para a série GalA_nHex₁, que corresponde ao oligossacarídeo constituído por três resíduos de ácido galacturónico e um resíduo de hexose é apresentado na Figura 4. A presença de ácido galacturónico é confirmada pela presença dos iões a m/z 537 e 361, que resultam da perda de uma molécula de GalA, seguida de perda de um resíduo de GalA. Por último, a confirmar a existência de um resíduo de hexose, verifica-se uma perda de -162 Da, dando origem ao ião m/z 199, correspondente a um aducto de sódio [GalA_{res}+Na]⁺.

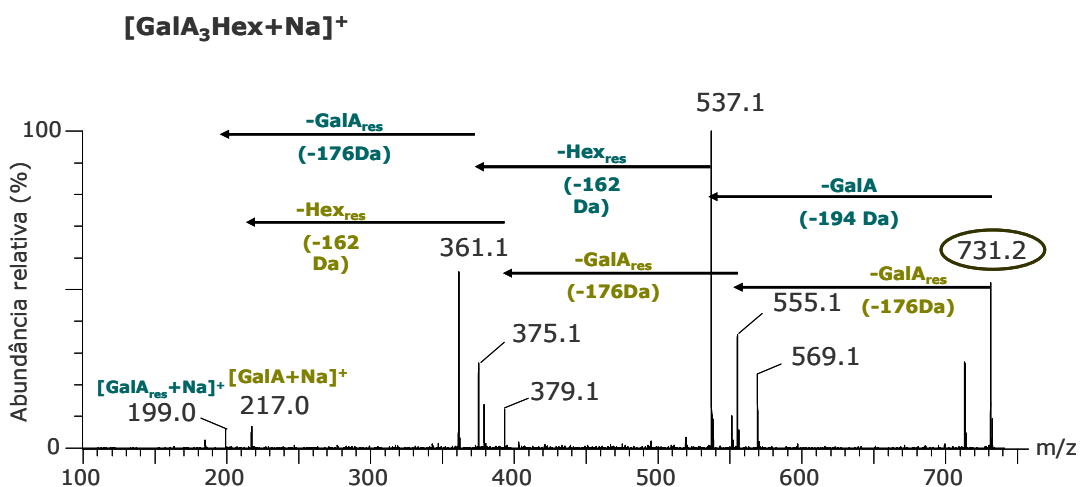


Figura 4 – Espectros de ESI-MS/MS relativo ao ião m/z 731.

A ligação de hexoses na cadeia principal de homogalacturonana é uma característica estrutural que ainda não tinha sido descrita para os

polissacarídeos pécticos. Esta característica estrutural foi observada não só nos polissacarídeos pécticos da pêra mas também nos da pectina comercial.

4. CONCLUSÕES

Após o trabalho efectuado, pode concluir-se que, relativamente à cromatografia de exclusão molecular, existe uma grande probabilidade de interacção dos polissacarídeos pécticos das amostras com a água destilada (pH~7) e a matriz de Biogel. No entanto, a utilização de água destilada a pH =2,7 pareceu ser uma boa solução para a eluição destes compostos, uma vez que, deste modo, é garantida a sua protonação.

Os polissacarídeos pécticos da pêra fresca e secada possuem uma estrutura semelhante e comparável à dos polissacarídeos pécticos de outros frutos, nomeadamente a pectina comercial obtida a partir de citrinos. A presença de resíduos de hexose ligados à cadeia principal dos resíduos de ácido galacturónico nos polissacarídeos pécticos é uma característica que merece ser explorada, pois poderá ajudar a compreender as propriedades que estes polissacarídeos possuem enquanto constituintes das paredes celulares das plantas.

Referências

- Coimbra, M. A., Delgadillo, I., Waldron, K. W., Selvendran, R. R. (1996). Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp. *Modern Methods of Plant Analysis*, 17, 19-44.
- Ferreira, D. M. S. (2003) Estudo das transformações bioquímicas e químicas e da pêra de S. Bartolomeu durante o processo de secagem – recurso endógeno da região de Viseu, Tese de doutoramento, Universidade de Aveiro.
- Nunes, C., Saraiva, J., Rocha, S., Coimbra, M. A. (2006). Simple and solvent-free methodology for simultaneous quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID). *Carbohydrate Polymers*, 64, 306–311.
- Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, W., O'Neill, M.A., Glushka, J., Darvill, A., Albersheim, P. (2000). Structural characterization of the Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate Research*, 326, 277-294.