

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAREN CRISTINA KAI

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILOGLUCANAS DE *Tamarindus indica***

CURITIBA

2009

KAREN CRISTINA KAI

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILOGLUCANAS DE *Tamarindus indica***

Monografia apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz.

CURITIBA

2009

Aos meus pais, por possibilitarem a realização de um dos meus maiores sonhos, além do amor e apoio incondicionais.

## TERMO DE APROVAÇÃO

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Waldir e Oriana, pelo amor, carinho, apoio (financeiro e emocional) e paciência durante a minha jornada acadêmica e também durante toda a minha vida. Vocês são as minhas pessoas preferidas no mundo. Mesmo do outro lado do mundo, vocês são de grande importância na minha vida e a base para a pessoa que sou hoje. Obrigada por tudo... Imensas saudades;

Aos meus irmãos: Kathya, Anderson e Lucas, pelo amor, carinho, conversas pelo telefone e MSN, apoio emocional e amizade;

À professora Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz, que através de suas aulas mostrou o quanto a Bioquímica pode ser fascinante, além de ser um exemplo de dedicação e persistência. Obrigada pela oportunidade e também pela orientação;

Às professoras Dra. Fany e Dra. Joana, por serem exemplos de profissionais e dedicação à Ciência, além dos momentos compartilhados e demonstrações de carinho e preocupação;

À minha grande amiga Patricia, por me apoiar durante o tempo em que moramos juntas, ouvir minhas lamentações e saudades, me fazer rir e reavaliar meus conceitos sobre muitas coisas nesta vida;

À Elisângela, pelas análises de GPC, amizade e momentos de conversas e risadas;

À Rosane, pelas análises de GLC e GLC-MS;

À Marianna, pelos puxões de orelha, momentos cômicos e conversas, além do apoio em meus momentos de conflitos e dicas para “o sucesso”;

À Lúcia, pela amizade, carinho, orientações e um exemplo de caráter, dedicação, profissionalismo. Obrigada pelas conversas, risadas, dicas e ouvir meus desabafos;

Ao pessoal do Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais: Heide, Andréa, Nicole, Marília, Meire, Rhayla e Patrícia, pela amizade, conversas e apoio nas minhas apresentações no EVINCI;

Ao João, pelas inúmeras conversas no MSN, noites Jamísticas, dicas de cinema e música, e pela amizade. Obrigada;

À Andréia, pelas análises de GPC, idas ao James e Wonka, conversas astrológicas e amizade;

Aos meus amigos de São José dos Campos/SP: Cláudia, Francyne, Silvana, André, Reginaldo, Mauro (meu afilhado), por serem importantes na minha vida e pela amizade, mesmo estando tão longe e muitos eu não visitar faz tempo;

Ao pessoal que conheci em Curitiba/PR: ao Diogo, pela amizade e idas ao J; à Luciane, Luana, Ariane e Izabel, pelas idas ao Rê Bordosa, jogos de truco no intervalo das aulas, momentos de risos e paciência nos dias de estresse; à Janaina, pela amizade, paciência e por compartilhar os momentos bons e ruins das Práticas de Ensino e estágios nas escolas; à Nazaré, Dragan, Vera e todos os outros moradores e ex-moradores da República Cajuru I, pelo apoio, amizade e tempo compartilhado durante o período que moramos juntos;

À Alexandra, pelos momentos de descontração nas aulas de francês, além das conversas, risadas, saídas noturnas e principalmente pela amizade e apoio durante esse tempo em Curitiba;

Ao Erick, pela notívaga companhia, risadas, dicas cinematográficas e musicais excelentes, conversas filosóficas e outras nem tão “filosóficas” assim;

À professora Maria Eugênia, por disponibilizar a coluna para realizar a cromatografia por troca iônica;

À Rosane, secretária da Coordenação do curso de Ciências Biológicas, por responder minhas dúvidas e por ajudar a resolver os “problemas” nas matrículas;

À Universidade Federal do Paraná, pelo ensino de qualidade e pelo suporte para a minha formação universitária;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo suporte material e oportunidade;

À Fundação Araucária e CNPq, pelo apoio financeiro durante meu período na Iniciação Científica;

A todas as outras pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu pudesse realizar esse trabalho e eu não tenha agradecido.

Muito obrigada a todos! Sentirei saudades...

Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,  
Muda-se o ser, muda-se a confiança;  
Todo o mundo é composto de mudança,  
Tomando sempre novas qualidades.

Luís de Camões

## RESUMO

Xiloglucanas são polissacarídeos hemicelulósicos encontrados na parede celular primária de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas, além de apresentar função de reserva em algumas sementes da família Leguminosae tal como *Tamarindus indica* (tamarindo). Xiloglucanas de tamarindo são utilizadas comercialmente, sendo utilizadas nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. Estruturalmente, as xiloglucanas tem uma cadeia principal de unidades de D-glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . A cadeia principal tem algumas unidades substituídas em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-xilose, esta podendo ser substituída em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-galactose. As unidades de  $\beta$ -D-galactose podem ser substituídas por  $\alpha$ -L-fucose na posição O-2, denominadas assim xiloglucanas fucosiladas. Após revisão na literatura, não foram encontrados estudos sobre xiloglucanas estruturais de tamarindo. Neste trabalho foram isoladas e caracterizadas as xiloglucanas de folhas e sementes de tamarindo obtidas por extrações sequenciais alcalinas e extração aquosa, respectivamente. Para isolamento das xiloglucanas de reserva (XG1), as sementes sofreram inativação enzimática por fervura. Os cotilédones foram separados manualmente, moídos, deslipidificados e submetidos à extração aquosa por 1h a 25°C. Para a obtenção das xiloglucanas estruturais, as folhas foram secas, moídas, despigmentadas, deslipidificadas e submetidas às extrações seqüenciais: aquosas (5 vezes), EDTA 2% (1 vez) e alcalinas com KOH a 1 e 4M (3 vezes cada), em diferentes tempos e temperaturas. Os extratos obtidos foram precipitados com etanol (3v) e ácido acético foi adicionado até o pH atingir 5,0. A partir da fração hemicelulose B da extração com KOH 4M (HB4), foi feita uma cromatografia em coluna por troca-iônica, para obtenção do polissacarídeo purificado, em seguida o extrato (HB4C) foi dialisado, resultando na fração HB4CD. Nas análises por HPSEC-MALLS/RI/UV, a fração XG1 apresentou um pico principal de alta intensidade, detectado simultaneamente pelo índice de refração e espalhamento de luz; a fração HB4CD mostrou-se heterogênea. As proporções Glc:Xyl:Gal determinadas por GLC para as frações obtidas foram semelhantes aos valores descritos na literatura para esses polissacarídeos. Os conteúdos de açúcar total, proteínas e ácido urônico foram determinados por métodos colorimétricos para as amostras obtidas das folhas. Análises dos espectros RMN  $^{13}\text{C}$  das frações HB4, HB4C e XG1 apresentaram na região anomérica sinais característicos de uma xiloglucana estrutural (HB4 e HB4C) e de reserva (XG1), diferindo pela ausência dos sinais para  $\beta$ -D-galactose substituída e  $\alpha$ -L-fucose na amostra XG1. Os resultados obtidos sugerem que a principal diferença entre xiloglucanas estruturais e de reserva obtidas das folhas e sementes de tamarindo, é a presença de fucose nas cadeias laterais do polissacarídeo das folhas, o que pode significar mudanças na conformação da molécula e provavelmente na interação com as microfibrilas de celulose.

Palavras-chave: Xiloglucana de reserva. Xiloglucana estrutural. *Tamarindus indica*. Fucose. Hemicelulose B.



## ABSTRACT

Xyloglucans are hemicellulosic polysaccharides found in the primary cell wall of dicotyledonous and some monocotyledonous, besides to present the storage function in some seeds of Leguminosae family, such as *Tamarindus indica* (tamarindo). Xyloglucans from tamarind are used commercially, being used in the food and pharmaceutical industries. Structurally, the xyloglucans have a linear backbone of D-glucose units, joined by glycosidic linkages  $\beta(1\rightarrow4)$ -type. The backbone have some residues substituted at O-6 by  $\alpha$ -D-xilose units, it can be substituted at O-2 by  $\beta$ -D-galactose units. The  $\beta$ -D-galactose units can be substituted by  $\alpha$ -L-fucose units at O-2 positions, denominadas assim fucosylated xyloglucans. After reviewing the literature, no studies were found on structural xyloglucans from tamarind. In this work we isolated and characterized the xyloglucans of leaves and seeds tamarind obtained by sequential alkaline extraction and aqueous extraction, respectively. For storage xyloglucans (XG1) storage, seeds suffered enzyme inactivation by boiling. The cotyledons were separated manually, milled, defatted and submitted to aqueous extraction for 1h at 25° C. To obtain the structural xyloglucans, the leaves were dried, milled, depigmented, defatted and submitted to sequential extractions: aqueous (5 times), EDTA 2% (once) and the 1 and 4M alkaline (KOH, 3 times each), at different times and temperatures. The extracts were precipitated with ethanol (3v) and acetic acid was added until the pH reaches 5.0. The hemicellulose B fraction from the extraction with 4M KOH (HB4), was made by column chromatography on ion exchange, to obtain the purified polysaccharide, then the extract (HB4C) was dialysed, resulting in fraction HB4CD. In the analysis by HPSEC-MALLS/RI/UV, the XG1 fraction showed a main peak of high intensity, detected by both the refraction index and light scattering; the fraction HB4CD showed to be heterogeneous. The proportions Glc:Xyl:Gal determined by GLC for the fractions obtained were similar to values reported in the literature for these polysaccharides. The contents of total sugar, protein and uronic acid were determined by colorimetric methods for samples obtained from the leaves. Analysis of  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of HB4, HB4C and XG1 fractions showed anomeric signals in the region characteristic of a structural (HB4 and HB4C) and storage (XG1) xyloglucan, differing by the absence of signals for  $\beta$ -D-galactose and  $\alpha$ -L-fucose replaced in the XG1 sample. The results suggest that the main difference between structural and storage xyloglucans obtained from the seeds and leaves tamarind, is the presence of fucose in the polysaccharide side chains, which could mean changes in the molecule conformation and likely differences in the interaction with the cellulose microfibrils.

Keywords: Storage xyloglucan. Structural xyloglucan. *Tamarindus indica*. Fucose. Hemicellulose B.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULAS VEGETAIS ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR.....	20
FIGURA 2 – MODELOS DE PAREDE PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II.....	22
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DE UM SEGMENTO DE CADEIA DE UMA XILOGLUCANA. GLUCOSE (G), XILOSE (X), GALACTOSE (L) E FUCOSE (F)....	24
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DIAGRAMATICAL DE UNIDADES ESTRUTURAIS DE (A) UM HEPTASSACARÍDEO DE XILOGLUCANA (XXLG) E (B), UM OCTASSACARÍDEO (XXXG), USANDO A NOMENCLATURA NÃO-AMBÍGUA DE FRY <i>et al.</i> (1993).....	25
FIGURA 5 – FOLHAS E FLORES DE TAMARINDO ( <i>Tamarindus indica</i> L.).....	33
FIGURA 6 - FRUTO (VAGEM), POLPA E SEMENTES DE TAMARINDO ( <i>Tamarindus indica</i> L.).....	34
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE TAMARINDO.....	45
FIGURA 8 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO HB4 OBTIDA DE FOLHAS DE TAMARINDO, COM DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV).....	49
FIGURA 9 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO HB4C OBTIDA DE FOLHAS DE TAMARINDO, COM DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV).....	51
FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO HB4CD OBTIDA DE FOLHAS DE TAMARINDO, COM DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV).....	51
FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA AMOSTRA HB4 EM D <sub>2</sub> O A 70°C.....	53
FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA AMOSTRA HB4C EM D <sub>2</sub> O A 70°C.....	54
FIGURA 13 - ESPECTRO DE DEPT-135 DA AMOSTRA HB4C EM D <sub>2</sub> O A 70°C....	56
FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE XILOGLUCANA DE COTILÉDONES DE TAMARINDO.....	57

FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO XG1 OBTIDA DE COTILÉDONES DE TAMARINDO, COM DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV).....	59
FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA AMOSTRA XG1 EM D <sub>2</sub> O A 70°C.....	60
FIGURA 17 - ESPECTRO DE DEPT-135 DA AMOSTRA XG1 EM D <sub>2</sub> O A 70°C.....	62

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RENDIMENTO, AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNAS DAS EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE TAMARINDO.....	47
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE TAMARINDO.....	48
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HB4 E HB4C OBTIDAS DAS FOLHAS DE TAMARINDO.....	50
TABELA 4 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\Delta$ ) DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS XILOGLUCANAS PRESENTES NAS FRAÇÕES HB4 E HB4C.....	55
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HB4C E XG1 OBTIDAS DE FOLHAS E SEMENTES DE TAMARINDO, RESPECTIVAMENTE.....	58
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\Delta$ ) DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS XILOGLUCANAS PRESENTES NAS FRAÇÕES XG1 E HB4C.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$ : Denota anomeridade alfa

$\beta$ : Denota anomeridade beta

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

CH<sub>2</sub> – Grupo etil

CH<sub>3</sub> – Grupo metil

DEPT- *Distortionless enhancement by polarization transfer*

DEAE – Dietilaminoetil

D<sub>2</sub>O - Óxido de deutério

EAF1 – Primeira fração obtida da folha de tamarindo por extração aquosa a 60°C (4 horas), seguida de precipitação com 3 volumes de etanol

EAF2 – Segunda fração obtida da folha de tamarindo por extração aquosa a 60°C (4 horas), seguida de precipitação com 3 volumes de etanol

EAF3 - Terceira fração obtida da folha de tamarindo por extração aquosa a 60°C (4 horas), seguida de precipitação com 3 volumes de etanol

EAF4 – Quarta fração obtida da folha de tamarindo por extração aquosa a 60°C (4 horas), seguida de precipitação com 3 volumes de etanol

EAF5 – Quinta fração obtida da folha de tamarindo por extração aquosa a 60°C (4 horas), seguida de precipitação com 3 volumes de etanol

EEDTA - Fração obtida da folha de tamarindo por extração com EDTA 2% aquoso a 25°C (3 horas)

Fuc – Fucose

Gal – Galactose

GLC - Cromatografia líquido-gasosa

Glc – Glucose

HA1 – Primeira fração obtida da folha de tamarindo por extração com KOH 1M a 25°C (5 horas), seguida de neutralização do extrato

HA2 – Segunda fração obtida da folha de tamarindo por extração com KOH 1M a 25°C (5 horas), seguida de neutralização do extrato

HA3 – Terceira fração obtida da folha de tamarindo por extração com KOH 1M a 25°C (5 horas), seguida de neutralização do extrato

HA4 – Quarta fração obtida da folha de tamarindo por extração com KOH 4M a 25°C (5 horas), seguida de neutralização do extrato

HA5 – Quinta fração obtida da folha de tamarindo por extração com KOH 4M a 25°C (5 horas), seguida de neutralização do extrato

HA6 – Sexta fração obtida da folha de tamarindo por extração com KOH 4M a 25°C (5 horas), seguida de neutralização do extrato

HB1 – Primeira fração obtida da folha de tamarindo remanescente no extrato da extração com KOH 1M a 25°C (5 horas) após neutralização e obtida por precipitação com etanol

HB2 – Segunda fração obtida da folha de tamarindo remanescente no extrato da extração com KOH 1M a 25°C (5 horas) após neutralização e obtida por precipitação com etanol

HB3 – Terceira fração obtida da folha de tamarindo remanescente no extrato da extração com KOH 1M a 25°C (5 horas) após neutralização e obtida por precipitação com etanol

HB4 – Quarta fração obtida da folha de tamarindo remanescente no extrato da extração com KOH 4M a 25°C (5 horas) após neutralização e obtida por precipitação com etanol

HB4C – Fração obtida da folha de tamarindo remanescente no extrato da extração com KOH 4M a 25°C (5 horas) após neutralização e obtida por precipitação com etanol, purificada por cromatografia em coluna por troca iônica

HB4CD – Fração obtida da folha de tamarindo remanescente no extrato da extração com KOH 4M a 25°C (5 horas) após neutralização e obtida por precipitação com etanol, purificada por cromatografia em coluna por troca iônica e dialisada.

HB5 – Quinta fração obtida da folha de tamarindo remanescente no extrato da extração com KOH 4M a 25°C (5 horas) após neutralização e obtida por precipitação com etanol

HB6 – Sexta fração obtida da folha de tamarindo remanescente no extrato da extração com KOH 4M a 25°C (5 horas) após neutralização e obtida por precipitação com etanol

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HPSEC - Cromatografia de exclusão estérica de alta performance

$K_m$  - Constante de Michaelis-Menten

KOH – Hidróxido de potássio

MALLS - Detector de espalhamento de luz laser em multiângulos

$M_w$  – Massa molecular média ponderal em peso

$NaBH_4$  - Boroidreto de sódio

$NaN_3$  - Azida de sódio

$NaNO_2$  - Nitrito de sódio

$NO^\bullet$  - Óxido nítrico

ppm – Partes por milhão

RF – Resíduo final

RI – Detector de índice de refração

RMN - Ressonância magnética nuclear

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

RPM – Rotações por minuto

TFA - Ácido trifluoracético

UV – Detector de ultravioleta

XET – Xiloglucana endotransglicosilase

XG1 - Fração obtida dos cotilédones de tamarindo por extração aquosa a 25°C (1 hora)

Xyl – Xilose

$\delta$  – Deslocamento químico

$\lambda$  – Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL.....	19
2.2 XILOGLUCANAS.....	23
2.2.1 Xyloglucanas estruturais.....	25
2.2.2 Xyloglucanas de reserva.....	28
2.3 <i>Tamarindus indica</i> (TAMARINDO).....	33
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
3.1 OBTENÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Tamarindus indica</i> .....	37
3.2 OBTENÇÃO DAS FOLHAS DE <i>Tamarindus indica</i> .....	37
3.3 ISOLAMENTO DOS COTILÉDONES DAS SEMENTES E INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA.....	37
3.4 OBTENÇÃO DAS XILOGLUCANAS DE RESERVA DAS SEMENTES.....	38
3.5 DESPIGMENTAÇÃO E DESLIPIDIFICAÇÃO DAS FOLHAS.....	38
3.6 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS FOLHAS.....	39
3.7 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS.....	40
3.8 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA.....	41
3.8.1 Hidrólises ácidas totais.....	41
3.8.2 Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise.....	41
3.9 PURIFICAÇÃO DAS XILOGLUCANAS DAS FOLHAS.....	42
3.10 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER MULTIÂNGULOS (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) e ULTRAVIOLETA (UV).....	43
3.11 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	43



<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
4.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE TAMARINDO ( <i>Tamarindus indica</i> ).....	44
4.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS COTILÉDONES DE SEMENTES DE TAMARINDO ( <i>Tamarindus indica</i> ) E COMPARAÇÃO COM OS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA FOLHA DE TAMARINDO).....	56
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

As xiloglucanas são polissacarídeos hemicelulósicos encontrados na parede celular primária de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas, além de apresentar função de reserva em algumas sementes da família Leguminosae.

A diferença entre os polissacarídeos estruturais e de reserva é muito tênue, isto é, muitos carboidratos presentes nas sementes possuem estrutura muito semelhante a dos encontrados na parede celular, sendo estes isolados de outros tecidos.

A xiloglucana das sementes de *Tamarindus indica* (tamarindo) é utilizada comercialmente devido à sua capacidade de produzir soluções aquosas viscosas, sendo esse um dos principais motivos para seu uso nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. Géis de xiloglucanas têm potencial como veículo para administração de fármacos (MIYAZAKI *et al.*, 1998; SUISHA *et al.*, 1998; KAWASAKI *et al.*, 1999; MIYAZAKI *et al.*, 2001; TAKAHASHI *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2009) e testes com oligossacarídeos obtidos de xiloglucanas de tamarindo, obtidos por digestão com celulase, mostraram efeitos no metabolismo de lipídios e absorção de D-glucose (SONE; MAKINO; MISAKI, 1992; YAMATOYA *et al.*, 1996).

Embora existam vários estudos relacionados às xiloglucanas de parede celular primária, após ampla revisão bibliográfica não foram encontrados estudos relacionados às xiloglucanas estruturais de *Tamarindus indica* (tamarindo). Em contrapartida, as xiloglucanas de reserva de tamarindo já foram bastante estudadas (YORK *et al.*, 1993; FREITAS *et al.*, 2005; SIMS *et al.*, 1998; LANG *et al.*, 1990, MARRY *et al.*, 2003).

Considerando-se a importância das xiloglucanas e seus potenciais usos, neste trabalho foram isoladas xiloglucanas de folhas e sementes de *Tamarindus indica* e comparadas as características estruturais dos polissacarídeos isolados. Além disto, as informações obtidas podem contribuir para o estabelecimento de relações estrutura-propriedades.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar xiloglucanas de sementes e de folhas de *Tamarindus indica*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar xiloglucana de reserva das sementes de *Tamarindus indica* (tamarindo) através de extração aquosa dos cotilédones;
2. Realizar extrações aquosas e alcalinas das folhas de *Tamarindus indica* (tamarindo) visando a obtenção de xiloglucana estrutural;
3. Purificar a xiloglucana das folhas;
4. Determinar a homogeneidade das xiloglucanas isoladas;
5. Caracterizar a estrutura das xiloglucanas isoladas;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

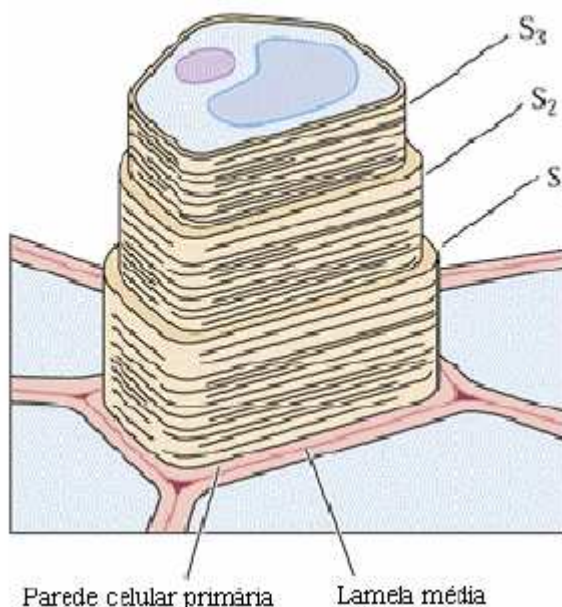
### 2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL

Uma das principais características para diferenciar uma célula vegetal de uma célula animal é a parede celular (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). A parede celular confere resistência mecânica à célula vegetal, contribui para a manutenção das condições hídricas “normais” e atua na junção entre as células (TAIZ; ZEIGER, 2004). Exerce grande influência na morfologia e no desenvolvimento da planta, limitando a taxa e a direção do crescimento celular, além de contribuir para a especialização funcional das células. É composta por proteínas, polissacarídeos e substâncias aromáticas (CARPITA; McCANN, 2000), sendo os polissacarídeos os componentes mais abundantes (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). A parede celular está presente em todos os estágios de desenvolvimento da célula vegetal (O’NEILL; YORK, 2003), sendo uma estrutura dinâmica que sofre alterações ao longo da vida celular.

Os polissacarídeos obtidos da parede celular vegetal têm sido extensivamente utilizados pelo homem. Sendo um produto natural, a utilização comercial é feita na fabricação de papel, manufaturas têxteis, fibras, carvão vegetal, construção civil e distintos produtos madeireiros. Além das aplicações mencionadas, os polissacarídeos nativos ou modificados são usados na fabricação de plásticos, filmes, tintas, adesivos, géis e espessantes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Hayashi (1989) são encontrados dois tipos de parede celular nas plantas superiores, parede primária e parede secundária, sendo diferenciadas por suas composições químicas e pelo período em que surgem no decorrer do desenvolvimento celular. A parede primária é produzida pela célula em divisão celular, podendo ter sua área de superfície aumentada durante a expansão celular, o que não ocorre na parede secundária. A parede secundária é produzida durante a diferenciação celular, internamente à parede primária e adaptada a função da célula. Entre as paredes primárias vizinhas encontra-se a lamela média, rica em pectina (RAVEN; EVERT;

EICHHORN, 2007). Na Figura 1 observa-se uma representação da parede celular primária e secundária (com as camadas S1, S2 e S3, sendo a letra S referente às camadas da parede secundária). A região de interfase entre as duas células vizinhas é a lamela média.



**FIGURA 1** - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULAS VEGETAIS ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR.

**FONTE:** CARPITA, N.; McCANN, M. (2000)

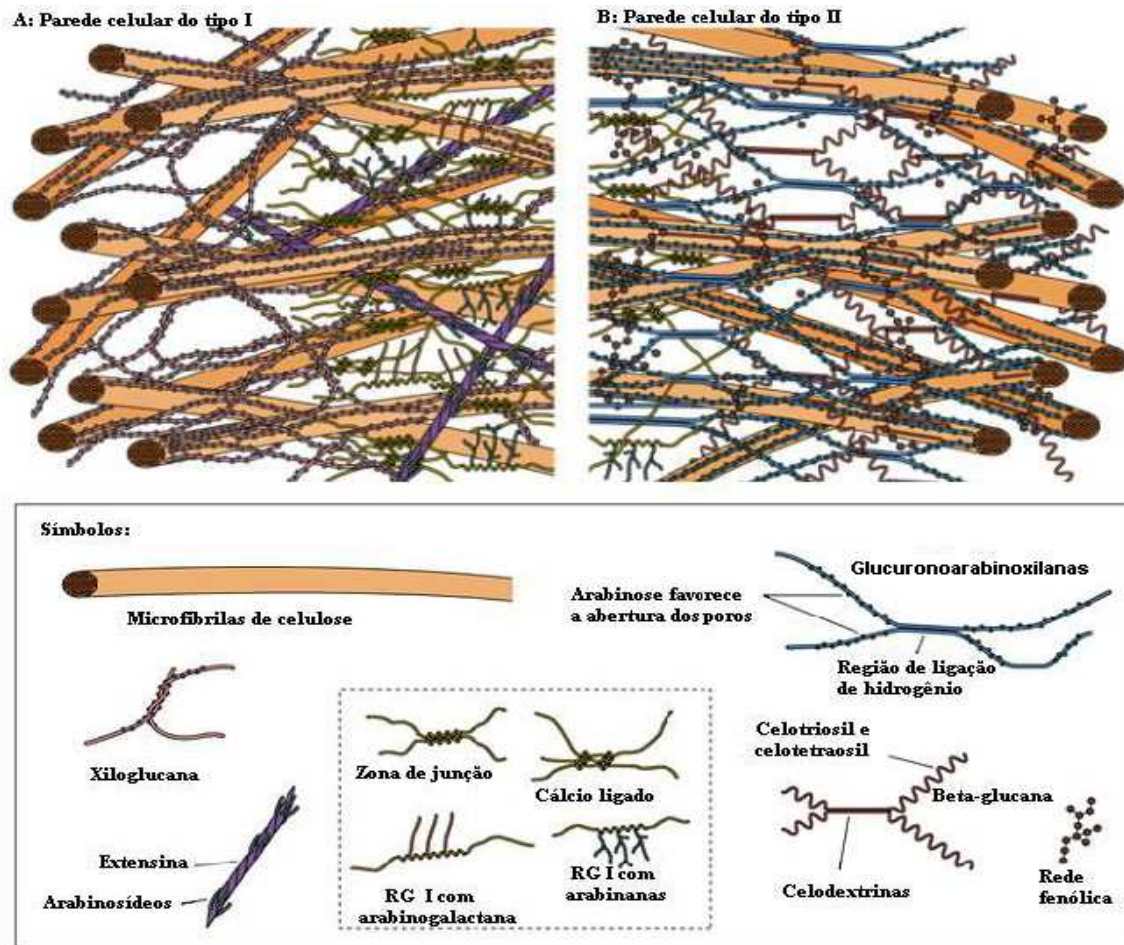
Além da função estrutural, a parede celular também atua como uma barreira de defesa contra patógenos e contém moléculas sinalizadoras participantes da comunicação célula-célula e parede-núcleo e moléculas na superfície que permitem reconhecer células invasoras. A parede celular pode conter moléculas que controlam o desenvolvimento e a posição das células na planta. Em circunstâncias específicas pode participar do reconhecimento inicial de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio (CARPITA; McCANN, 2000).

Em 1973, Albersheim e colaboradores apresentaram pela primeira vez um modelo de parede celular primária. Nesse estudo foi demonstrada de forma conjunta a interação dos diferentes componentes conhecidos, celulose, hemiceluloses, pectinas e

proteínas como elementos associados, estabelecendo assim um modelo básico. Nesse modelo, as xiloglucanas estariam ligadas à microfibrilas de celulose através de pontes de hidrogênio, enquanto que associações covalentes ligariam outros polissacarídeos como ramnogalacturonanas e arabinogalactanas, bem como uma glicoproteína (KEEGSTRA *et al.*, 1973; ALBERSHEIM, 1975). Posteriormente, Hayashi (1989) e Fry (1989) propuseram que as microfibrilas de celulose seriam interconectadas por pontes de hidrogênio ao longo das cadeias de xiloglucana. Polissacarídeos pécticos e proteínas participariam independentemente, envolvendo o complexo celulose-xiloglucana de maneira não-covalente.

O modelo de parede celular primária proposto por Carpita e Gibeaut (1993) é atualmente o mais aceito. Com base nas diferenças na quantidade de polissacarídeos pécticos e hemicelulose principal, estes autores propuseram dois tipos de estruturas para as angiospermas. A parede do tipo I, que inclui a parede das espécies de dicotiledôneas em geral e algumas monocotiledôneas (não comelinóides) e a parede do tipo II corresponde a maior parte das monocotiledôneas (comelinóides). Na Figura 2, observam-se os modelos de parede primária do tipo I e do tipo II.

A parede do tipo I é composta por uma rede de fibras de celulose entrelaçadas com xiloglucanas, formando uma rede celulose-xiloglucana, a qual compreende 50% da parede celular. As xiloglucanas ligam-se firmemente as microfibrilas de celulose e são longas o suficiente para estender-se e ligar duas microfibrilas. Esta rede de celulose-xiloglucana está embebida por uma matriz de pectina (20-35%), a qual controla entre outras propriedades fisiológicas, a porosidade. Além disso, a parede do tipo I contém outros polissacarídeos hemicelulósicos em menor proporção e grande quantidade de proteínas estruturais, sendo a principal a extensina, que pode interagir com os polissacarídeos. Algumas paredes do tipo I contêm grande quantidade de proteínas, principalmente básicas, que podem interagir com a matriz de pectina. (CARPITA; McCANN, 2000).



**FIGURA 2 - MODELOS DE PAREDE PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II.**  
**FONTE:** CARPITA, N.; McCANN, M. (2000)

Na parede celular do tipo II, diferentemente da parede celular do tipo I, as microfibrilas de celulose estão interligadas às glucuronoarabinoxilanas, as quais constituem a hemicelulose principal. Em geral, a parede do tipo II possui menor proporção de pectina (10%), porém o aumento da densidade de carga é proveniente das unidades de ácido glucurônico da hemicelulose. A quantidade de proteínas estruturais também é menor na parede tipo II, entretanto estas apresentam compostos fenólicos que participam na formação de ligações cruzadas entre os polissacarídeos (CARPITA; McCANN, 2000).

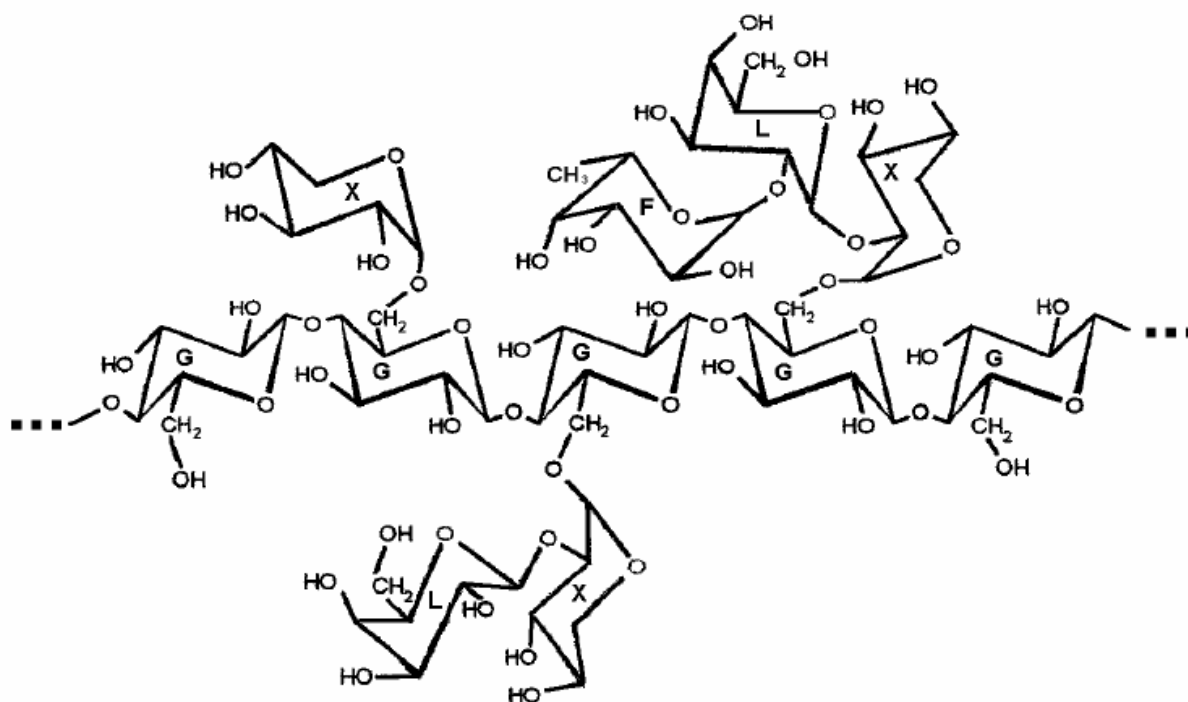
Entre os diferentes componentes da parede celular, serão abordadas as xiloglucanas, as quais constituem objeto de estudo deste trabalho.

## 2.2 XILOGLUCANAS

As xiloglucanas são polissacarídeos que apresentam funções distintas no vegetal. Possuem um importante papel estrutural por estarem presentes na parede celular primária de vegetais superiores, além de atuarem como material de reserva em sementes de certas espécies de dicotiledôneas. As xiloglucanas também podem apresentar função regulatória, pois seus oligossacarídeos, os quais são denominados oligossacarinas, funcionam como moléculas sinalizadoras que regulam o crescimento celular (KOOIMAN, 1960; McNEIL *et al.*, 1984; HAYASHI, 1989). Estes polissacarídeos não são digeridos pelas enzimas digestivas humanas, atuando como fibras dietéticas (PICOUT *et al.*, 2003).

Estruturalmente, as xiloglucanas de reserva são formadas de uma cadeia de unidades D-glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . A cadeia principal pode ser substituída em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-xilose, a qual também pode ser substituída em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-galactose. Nas xiloglucanas de parede primária das dicotiledôneas, as unidades de  $\beta$ -D-galactose, podem ser substituídas, por sua vez, por unidades de  $\alpha$ -L-fucose na posição O-2, sendo denominadas xiloglucanas fucosiladas (CARPITA; McCANN, 2000; CARPITA; GIBEAUT, 1993; FRY, 1989; HAYASHI, 1989). Segundo Hayashi (1989), as xiloglucanas de parede primária presentes nas monocotiledôneas apresentam menos xilose e muito menos galactose do que as xiloglucanas de dicotiledôneas, inclusive não apresentando fucose terminal. Na Figura 3 observa-se a representação da estrutura química de um segmento de cadeia de uma xiloglucana.

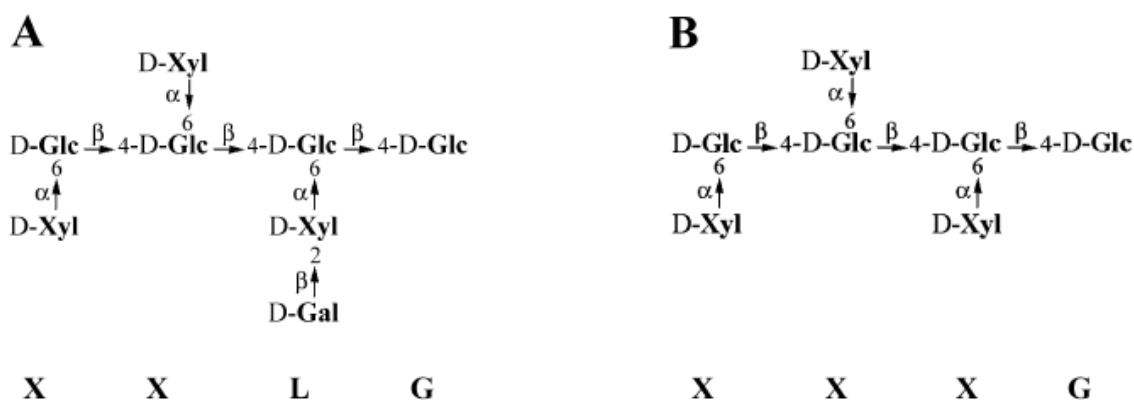




**FIGURA 3** - REPRESENTAÇÃO DE UM SEGMENTO DE CADEIA DE UMA XILOGLUCANA. GLUCOSE (G), XILOSE (X), GALACTOSE (L) E FUCOSE (F)

**FONTE:** PETKOWICZ *et al.* (2006)

Fry *et al.* (1993) sugeriram uma nomenclatura não-ambígua para os oligossacarídeos de xiloglucanas, nas quais as cadeias laterais são nomeadas através das unidades monossacarídicas que não são substituídas, da ponta não redutora para a redutora da cadeia principal. As unidades de glucose da cadeia principal, substituídas por xilose são representadas pela letra X, enquanto que unidades de glucose sem substituinte pela letra G. Para as unidades de galactose, arabinose e fucose, presentes como terminais não-redutores, empregam-se as letras L, S e F, respectivamente. Quando a unidade redutora de cada oligossacarídeo está sob a forma reduzida acrescenta-se a terminação ol. Na Figura 4 observa-se a representação de oligossacarídeos de xiloglucanas utilizando a nomenclatura não-ambígua de Fry *et al.* (1993).



**FIGURA 4** - REPRESENTAÇÃO DAS UNIDADES ESTRUTURAIS DE (A) UM OCTASSACARÍDEO DE XILOGLUCANA (XXLG) E (B), UM HEPTASSACARÍDEO (XXXG), USANDO A NOMENCLATURA NÃO-AMBÍGUA DE FRY *et al.* (1993)

**FONTE:** MARRY *et al.* (2003)

### 2.2.1 Xiloglucanas estruturais

As xiloglucanas na parede celular primária encontram-se associadas às microfibrilas de celulose formando uma rede de polissacarídeos, sendo considerada como o principal sistema de controle da expansão celular (ZABLACKIS *et al.*, 1995). Geralmente, as xiloglucanas compreendem 20-25% das paredes primárias de dicotiledôneas e 2% das monocotiledôneas (McNEIL *et al.*, 1984; FRY, 1989; HAYASHI, 1989; VARNER; LIN, 1989), sendo que foram identificadas também em gimnospermas (KAKEGAWA; EDASHIGE; ISHI, 1998; BOCHICCHIO, 2003). As xiloglucanas presentes nas sementes de algumas espécies de dicotiledôneas são utilizadas pelo embrião, desaparecendo após a germinação, sendo considerados como carboidratos de reserva (HAYASHI, 1989).

As xiloglucanas são importantes componentes da parede celular primária, visto que sua ocorrência tem sido universal e sofre notável decréscimo durante o desenvolvimento da planta (HAYASHI, 1989), mas os mecanismos de biossíntese ainda não estão totalmente compreendidos. Cavalier *et al.* (2008), isolaram e caracterizaram XXT1 e XXT2, genes que codificam xilosiltransferases, importantes na biossíntese de

xiloglucanas. Os autores demonstraram que mutações nesses genes em *Arabidopsis thaliana*, fizeram com que estas plantas apresentassem redução da produção de xiloglucana, afetando suas propriedades mecânicas. A xiloglucana é estruturalmente semelhante à celulose (HAYASHI, 1989), ambas possuindo a cadeia principal formada de unidades de D-glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ .

As xiloglucanas estruturais podem ser extraídas a partir de material despectinado através de extrações com álcalis fortes (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; SUN *et al.*, 2006; PAREDES, 2009). Alguns trabalhos descrevem a obtenção de xiloglucanas fucosiladas a partir de folhas de diferentes espécies. Em folhas imaturas de repolho (*Brassica oleraceae*), a xiloglucana é o principal polissacarídeo hemicelulósico (STEVENS; SELVENDRAN, 1984). Busato, Vargas-Rechia e Reicher, (2001) isolaram xiloglucanas fucosiladas de folhas de jatobá (*Hymenaea courbaril*) e demonstraram que o polissacarídeo apresenta unidades de xilose ligadas a galactose em O-4, além da substituição em O-2, diferindo da estrutura clássica das xiloglucanas de parede celular. Quando comparado a xiloglucana das sementes da mesma espécie, os autores verificaram que o polímero estrutural possui uma massa molecular bem menor que aquela determinada para a xiloglucana de reserva. As diferenças observadas podem estar relacionadas com as diferentes funções desempenhadas por estes polissacarídeos. Ray *et al.* (2004), obtiveram de folhas de *Argania spinosa* os oligossacarídeos XXXG, XXFG, XLFG, XXLG/XLXG, XLLG e um novo fragmento XUFG, sendo a letra U utilizada para designar a cadeia lateral  $\beta$ -Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Xylp identificada neste estudo. Sun *et al.* (2006) obtiveram polissacarídeos de parede celular de folhas de chicória (*Cichorium intybus* L.), na qual a composição monossacarídica e análise de metilação sugerem a presença de xiloglucana fucosilada.

Xiloglucanas estruturais de parede celular primária também podem ser obtidas de outros tecidos vegetais. Doco *et al.* (2003) obteve xiloglucanas de parede celular de exocarpo e mesocarpo de uvas por extrações alcalinas com composição monossacarídica de Glc:Xyl:Gal:Fuc nas proporções de 4:1,7:1,8:0,4 e 4:1,5:2,5:0,5, respectivamente. Os oligossacarídeos obtidos demonstraram a presença de xiloglucanas fucosiladas.

Sengkhampan et al. (2008), a partir de frações alcalinas extraídas de vagem de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), obtiveram amostras que apresentaram altas quantidades de glucose, xilose, além de galactose e fucose, sugerindo a presença de xiloglucanas. Além disso, ao tratar as amostras com xiloglucanases, obtiveram como principais oligossacarídeos XXXG, XXFG e XLFG, além dos oligossacarídeos XLXG, XXLG e XLFG, sugerindo a presença de xiloglucanas fucosiladas na parede celular. Paredes (2009) obteve frações alcalinas extraídas de “farinha” e raízes de maca (*Lepidium meyenii*), as quais apresentaram composição monossacarídica características de xiloglucana estrutural.

Em cultura de células de folhas e caule de *Echinacea purpurea* foram isoladas xiloglucanas fucosiladas com atividade imunológica, capazes de estimular o sistema fagocitário humano (WAGNER et al., 1988). Kato et al. (2001) observaram que xiloglucanas extraídas da parede celular de diversas frutas comerciais e seus oligossacarídeos mostraram efeitos inibitórios no crescimento de células tumorais humanas COLO 201 e constataram que este efeito nas células provavelmente é dependente da cadeia lateral (fucose e/ou galactose) das xiloglucanas.

Vários estudos têm sido feitos em relação a atividades biológicas de xiloglucanas, tanto em organismos vegetais, quanto em organismos animais. Os oligossacarídeos obtidos de xiloglucana demonstraram atividade como inibidores de crescimento, isto é, função antiauxínica. Esta atividade foi evidenciada, *in vivo* e *in vitro*, em concentrações de 1 a 100 nM, com os oligossacarídeos fucosilados XXFG, XFFG, GXFG, XLFG, FG e fucosil lactose, de diferentes fontes. O oligossacarídeo XXFGol ( $10^{-8}$  M) demonstrou inibir a elongação mediada por 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) em segmentos de caule de ervilha (YORK et al., 1984; McDOUGALL; FRY, 1989a; 1989b; AUGUR et al., 1992). York et al. (1984) observaram que o nonassacarídeo fucosilado XXFG, gerado pelo tratamento de xiloglucana de *Acer pseudoplatanus* ou células cultivadas de *Rosa* sp. com celulase fúngica, inibia o crescimento induzido por ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em segmentos de caule de ervilha. O nonassacarídeo fucosilado XXFG inibe o crescimento celular, ou seja, apresenta atividade antiauxínica, a qual ocorre devido à presença da unidade  $\alpha$ -L-fucopiranosil na cadeia lateral da xiloglucana ligada em O-2 da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosil, sendo

a atividade ótima antiauxínica a  $10^{-9}$  mol/L de XXFG. O undecassacarídeo XFFG, o qual contém duas cadeias laterais com galactose-fucose, é mais efetivo do que o nonassacarídeo na inibição do crescimento estimulado por 2,4-D. Já o nonassacarídeo não-fucosilado XLLG comporta-se aparentemente como um ativador do crescimento celular. Esta capacidade dos oligossacarídeos de xiloglucana de restaurar ou induzir o crescimento em plantas se deve à sua capacidade de estimular a atividade da xiloglucana endotransglicosilase (XET) (DARVILL *et al.*, 1992). A atividade biológica dos oligossacarídeos derivados de xiloglucanas pode estar relacionada com o número e tipo de unidades monossacarídicas que compõem o oligossacarídeo (McDOUGALL; FRY, 1990; VARGAS-RECHIA *et al.*, 1998).

A atividade xiloglucana endotransglicosilase (XET) foi identificada em células extraídas de diferentes plantas, como em ervilha e tomate (SMITH; FRY, 1991; FARKAS *et al.*, 1992; POTTER; FRY, 1993, 1994). Esta enzima é capaz de catalisar a reação de transferência de uma porção de cadeia de xiloglucana para o oligossacarídeo de xiloglucana. Estudos iniciais indicaram o XXFG como o oligossacarídeo acceptor. Esta enzima tem alta especificidade por xiloglucana como um glicosil doador, o  $K_m$  para XXFG foi de 50  $\mu$ M, pH 5,5 (FRY *et al.*, 1992).

Oliveira Junior, Braga e Buckeridge (2006) testaram a atividade de oligossacarídeos de xiloglucana obtidos de sementes de copaíba (XLLG) e suspensões celulares de feijão (XXFG e XXXG) em suspensões celulares de *Rudgea jasminoides*. O oligossacarídeo XLLG promoveu aumento da secreção de prótons para o meio extracelular, acidificando o meio de cultura, enquanto que XXFG inibiu este processo. Além disso, todos os oligossacarídeos induziram aumento nas atividades de  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucosidase, enzimas importantes na biossíntese de xiloglucanas.

### 2.2.2 Xiloglucanas de reserva

Uma das estratégias de adaptação a diferentes ambientes que as Angiospermas apresentam é o acúmulo de compostos de reserva em suas sementes,

sendo os polímeros de carboidratos os compostos selecionados durante a evolução. (BUCKERIDGE *et al.*, 2000). Os polissacarídeos de reserva são compostos acumulados durante o crescimento e desenvolvimento, armazenados no período de dormência e utilizados para fornecimento de monossacarídeos para um novo ciclo de crescimento. Em várias sementes, a parede celular secundária dos tecidos de reserva contém um grande depósito de polissacarídeos, que são digeridos durante a germinação e convertidos em sacarose para transporte na jovem planta (CARPITA; McCANN, 2000). Esses polissacarídeos são as principais fontes de carbono para os processos de biossíntese e utilizados pelo metabolismo das plantas para geração de energia (BUCKERIDGE *et al.*, 2000). Além do amido, há diversos tipos de polissacarídeos de reserva entre eles: mananas, galactomananas, galactoglucomananas, glucanas e xiloglucanas (AVIGAD; DEY, 1997).

A parede celular de cotilédones de sementes de *Tamarindus indica* e outras leguminosas é rica em xiloglucanas de reserva (CARPITA; McCANN, 2000). As xiloglucanas de reserva também são chamadas de amilóides devido a sua característica semelhante ao amido de apresentar coloração azul após tratamento com solução de iodo/iodeto de potássio (GAILLARD, 1961; KOOIMAN, 1961; AVIGAD; DEY, 1997).

As xiloglucanas de reserva podem ser extraídas das sementes de dicotiledôneas de plantas da família Leguminosae na forma praticamente pura através de extrações aquosas com elevados rendimentos, podendo chegar a 40-45% do peso da semente seca (PETKOWICZ *et al.*, 2006). A extração dos polissacarídeos de sementes envolve moagem, extração aquosa e precipitação com etanol. A caracterização estrutural é realizada por métodos químicos (hidrólise, metilação e oxidação por periodato) e espectroscópicos (ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho, etc) e os respectivos pesos moleculares por cromatografia de gel permeação ou outros procedimentos padrão (osmometria, espalhamento de luz). As xiloglucanas de sementes de *Hymenaea courbaril* podem formar agregados em solução aquosa, os quais podem ser reduzidos e/ou eliminados após aquecimento (FREITAS *et al.*, 2005).

Estes polissacarídeos propiciam um aumento da viscosidade de soluções aquosas diluídas e, por isso, têm aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, principalmente. A homogeneidade, baixo grau de contaminantes (tais como proteínas), alta viscosidade intrínseca e massa molecular das xiloglucanas sugerem um potencial ideal para uso nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, onde podem ser usadas como espessantes, por exemplo (STUPP *et al.*, 2007). Controlando as propriedades reológicas elas conferem características desejadas aos produtos, como estabilidade, textura e controle na liberação de fármacos (DEA; MORRISON, 1975).

As primeiras descrições das xiloglucanas vieram dos trabalhos de Kooiman (1957; 1967), onde as xiloglucanas foram extraídas de sementes de diferentes fontes, tais como: *Tamarindus indica*, *Tropaeolum majus*, *Cyclamen europaeu*, *Impatiens balsamina*, *Hymenaea courbaril*, *Schotia latifolia* e *Annona muricata*.

Vários estudos já foram realizados com xiloglucanas de sementes de *Tamarindus indica* (tamarindo) visando sua caracterização estrutural, de seus oligossacarídeos obtidos quimicamente ou enzimaticamente e das propriedades reológicas do polissacarídeo nativo e modificado (sulfatados e alquilaminado) (YORK *et al.*, 1993; FREITAS *et al.*, 2005; SIMS *et al.*, 1998; MARRY *et al.*, 2003). Segundo a divisão proposta por Vincken *et al.* (1997) esta espécie pertence ao grupo poli-XXXG.

Outra espécie muito estudada pela presença de xiloglucanas em suas sementes é a *Hymenaea courbaril* (jatobá). Kooiman (1960) foi o primeiro a sugerir a presença de xiloglucana nos cotilédones desta espécie e posteriormente, Buckeridge e Dietrich (1990) confirmaram este dado. A partir de análises de metilação e dos oligossacarídeos, sua estrutura foi determinada mostrando-se semelhante à xiloglucana de tamarindo (LIMA *et al.*, 1993; 1995). Buckeridge *et al.* (1997), com a utilização de  $\alpha$ -xilosidase e  $\beta$ -glucosidase observaram a existência de uma nova família de oligossacarídeos nesta espécie quando comparada com as xiloglucanas provenientes das sementes de *Tamarindus indica* e *Copaifera langsdorffii* (copaíba). Estas apresentavam principalmente os oligossacarídeos XXXG, XLXG, XXLG e XLLG, enquanto que no jatobá além destas estruturas foi observada a presença de aproximadamente 50% de oligossacarídeos pertencentes à série XXXXG.

A xiloglucana de sementes de jatobá, após tratamento com endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase forneceu principalmente o octassacarídeo XXLG e o heptassacarídeo XXXG. Na sua forma reduzida, o XXLGol foi capaz de atuar como molécula sinalizadora, a qual promoveu o crescimento de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*) (VARGAS-RECHIA *et al.*, 1998). LIMA-NISHIMURA *et al.* (2003) observaram que em meio de cultura para micropropagação, enriquecido com xiloglucana de sementes de jatobá, o desenvolvimento de plântulas provenientes de duas espécies da macieira (*Malus prunifolia* e *Malus domestica*) foi superior ao controle. Salamoni *et al.* (2008) compararam xiloglucanas de sementes de jatobá de dois locais diferentes e de tamarindo em plântulas de *Arabidopsis thaliana* e constataram que a xiloglucana de *Tamarindus indica* foi a que teve o efeito negativo menos pronunciado no crescimento radicular. Kai; Gabardo; Petkowicz (2008) demonstraram que a xiloglucana obtida de cotilédones de *Hymenaea courbaril* e seus oligossacarídeos apresentaram efeitos positivos no crescimento de plântulas de ervilhas, sendo o polissacarídeo mais efetivo.

Buckeridge e Dietrich (1990) observaram a presença de xiloglucanas nos cotilédones de *Copaifera langsdorfii*. Em estudos posteriores foram comparados aspectos estruturais deste polissacarídeo obtido de sementes de regiões distintas (savana e floresta) com a xiloglucana do tamarindo. Os autores constataram que a composição monossacarídica é muito semelhante e os oligossacarídeos obtidos por digestão enzimática foram os mesmos para as amostras analisadas, porém em diferentes proporções para cada espécie e região (BUCKERIDGE *et al.*, 1992; 1997).

Lima e Buckeridge (2001) estudaram a interação entre xiloglucanas de reserva de diferentes fontes com a celulose. Os resultados sugeriram que as unidades de galactose influenciam na interação entre a xiloglucana e a celulose, mas que depende também da área de superfície da celulose. Lima, Loh e Buckeridge (2004), ao estudarem uma xiloglucana de reserva, sugerem que a interação entre a celulose e as xiloglucanas depende da estrutura fina da cadeia lateral (ausência/presença de fucose e grau de distribuição da galactose) e da massa molecular ( $M_w$ ) das xiloglucanas.

Lima, Oliveira e Buckeridge (2003) analisaram os efeitos de xiloglucanas de sementes de diferentes espécies (*Hymenaea courbaril*, *Copaifera langsdorfii*, *Tamarindus indica* e *Tropaelum majus*) como aditivo na fabricação de papel, e



verificaram que estes polissacarídeos melhoraram as propriedades mecânicas sem alterar as propriedades ópticas, tais como a opacidade.

Maeda *et al.* (2007) estudaram os efeitos da xiloglucana nas propriedades físicas da massa e na qualidade do pão, notando-se aumento na estabilidade da massa e melhora da maciez do pão.

A xiloglucana da tamarindo é utilizada comercialmente devido as suas propriedades espessantes. Yamanaka *et al.* (2000) verificaram que a xiloglucana de semente de tamarindo sofre gelificação termorreversível na presença de etanol, formando gel em temperaturas mais baixas, mas Shirakawa, Yamatoya e Nishinari (1998) em estudo anterior, ao tratar a xiloglucana com  $\beta$ -galactosidase, observaram a formação de gel em altas temperaturas, sugerindo a associação das cadeias principais por interações hidrofóbicas. Busato *et al.* (2009), ao comparar a xiloglucana nativa de cotilédones de *Hymenaea courbaril* com xiloglucana tratada com  $\beta$ -galactosidase, demonstraram que a remoção de aproximadamente 51% da galactose resultou em estrutura de gel verdadeiro. A temperatura de transição de sol-gel varia de acordo com o grau de eliminação de galactose. Vários estudos têm mostrado que o gel obtido de xiloglucanas têm potencial como veículo para a liberação controlada de fármacos, podendo ser administrado por via retal (MIYAZAKI *et al.*, 1998), intraperitoneal (SUISSA *et al.*, 1998), oral (KAWASAKI *et al.*, 1999), ocular (MIYAZAKI *et al.*, 2001), percutânea (TAKAHASHI *et al.*, 2002) e trato gastrointestinal (RIBEIRO *et al.*, 2009). Análises reológicas também foram realizadas com xiloglucanas de jatobá e seu complexo com tetraborato mostrando que há um aumento da viscosidade aparente quando a mesma está complexada (MARTINS *et al.*, 2003).

Resultados recentes obtidos por Rosário *et al.* (2008) mostraram que as xiloglucanas isoladas dos cotilédones *Hymenaea courbaril* exibiram propriedades moduladoras das funções de macrófagos através da capacidade de estimular a via de produção de NO\* *in vitro* e a elevada capacidade de recrutar macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos *in vivo*.

### 2.3 *Tamarindus indica* (TAMARINDO)

O tamarindo (*Tamarindus indica* L.) é uma planta arbórea, pertencente à família Leguminosae (Caesalpiniaceae) (PAULA *et al.*, 2009), a mesma família do jatobá (*Hymenaea courbaril*) e copaíba (*Copaifera langsdorffii*). É uma planta dicotiledônea (MAITI *et al.*, 2004), nativa da África tropical de onde se dispersou para todo o mundo (DONADIO, 1988; GURJÃO *et al.*, 2006). É também encontrada na América do Norte e América do Sul, desde a Flórida até o Brasil, sendo cultivada também na China, Índia, Paquistão, Indochina, Filipinas, Java e Espanha (MARTINELLO *et al.*, 2006). É muito utilizada pela medicina tradicional tailandesa, segundo a qual a fruta é digestiva, laxante, expectorante, carminativa (antiflatulência) e um tônico para o sangue (KOMUTARIN *et al.*, 2004). A árvore de tamarindo pode atingir de 20-40 m de altura, ramas longas e flexíveis (PEIXOTO *et al.*, 2006). As folhas (Figura 5) são alternas e regularmente penadas. As flores (Figura 5) são branco-amareladas e manchadas de vermelho, cuja disposição na inflorescência é em forma de cachos.



**FIGURA 5 – FOLHAS E FLORES DE TAMARINDO (*Tamarindus indica* L.)**  
**FONTE:** SCHATZ, G. E.; FREELAND, C. (2007)

O fruto (Figura 6) é uma vagem oblonga nas pontas, achatada, longa, indeiscente, com epicarpo espesso e mesocarpo polposo e de cor parda envolvendo as sementes. A casca é pardo-escura, lenhosa e quebradiça (DONADIO, 1988; GURJÃO *et al.*, 2006; PEIXOTO *et al.*, 2006). No início seus frutos são marrom-avermelhados, tornando-se mais tarde pretos ou marrons escuros. Quando amadurecem, os frutos são aromáticos e azedos. A polpa é usada principalmente para a preparação de alimentos (doces, sorvetes), sucos concentrados, sendo também utilizada na preparação de bebidas (licores), temperos, “curry” e molhos (SIDDHURAJU; VIJAYAKUMARI; JANARDHANAN, 1995; GURJÃO *et al.*, 2006; MARTINELLO *et al.*, 2006).

As sementes são achatadas, obovado-orbiculares, de 3-8 por vagem, brancas e cobertas por uma testa marrom (DONADIO, 1988; BHATTACHARYA *et al.*, 1992; GURJÃO *et al.*, 2006; PEIXOTO *et al.*, 2006). As sementes são tostadas e consumidas na alimentação, consideradas fontes alternativas de proteínas (SIDDHURAJU; VIJAYAKUMARI; JANARDHANAN, 1995). Também são utilizadas como anti-helmínticas, antidiarréica, e a casca é usada para tratar queimaduras e como antidisentérico (FARNSWORTH; BUNYAPRAPHATSARA, 1992; KOMUTARIN *et al.*, 2004).



**FIGURA 6** – FRUTO (VAGEM), POLPA E SEMENTES DE TAMARINDO (*Tamarindus indica* L.)

**FONTE:** [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Tamarind\\_pods\\_edible\\_part.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Tamarind_pods_edible_part.jpg) (acesso em 30/06/2009)

Comercialmente a xiloglucana utilizada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos provém de *Tamarindus indica* (tamarindo). A estrutura deste polissacarídeo já é conhecida e oligossacarídeos obtidos a partir de xiloglucana de semente de tamarindo foram extensivamente estudados. MARRY *et al.* (2003) isolaram oligossacarídeos de xiloglucanas de sementes de tamarindo por hidrólise enzimática completa (XXXG, XLXG, XXLG e XLLG) e ácida parcial (XGXG, XXGG, GGXG, GXXG e XGGG). Xiloglucanas de semente de tamarindo (*T. indica*) conferiram maior viscosidade, propriedades reológicas iguais as de um líquido e estabilidade no calor de gelatinização de misturas de fécula de tapioca e xiloglucanas (PONGSAWATMANIT *et al.*, 2006).

O tamarindo, tanto as sementes quanto os frutos, tem sido muito estudado quanto às suas atividades biológicas, tais como: utilização de extrato obtido de casca de sementes de tamarindo na modulação da produção de óxido nítrico em macrófagos de ratos (KOMUTARIN *et al.*, 2004), do extrato aquoso das sementes na redução nos níveis de açúcar sanguíneo (MAITI *et al.*, 2004), do extrato metanólico da planta atividade antibacteriana (MELÉNDEZ; CAPRILES, 2006), do extrato hidroalcoólico bruto do fruto na modulação de desgranulação e metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos (PAULA *et al.*, 2009). MARTINELLO *et al.*, 2006, verificaram em testes com hamsters que extratos da polpa do fruto de tamarindo promoveram redução do colesterol total, triglicerídeos e LDL e aumento do HDL no soro, além de possuir atividade antioxidante.

Muitos estudos quanto às atividades biológicas de xiloglucanas de tamarindo têm sido feitos. Testes com oligossacarídeos de tamarindo, obtidos por digestão com celulase, mostraram efeitos no metabolismo de lipídios, diminuído o nível sanguíneo de colesterol e triglicerídeos em ratos (YAMATOYA *et al.*, 1996), além de inibir a absorção de D-glucose (SONE; MAKINO; MISAKI, 1992). Xiloglucanas de tamarindo modificadas, apresentando diferentes graus de sulfatação exibiram atividade antiviral contra o vírus da rubéola (MASTROMARINO *et al.*, 1997). COVIELLO *et al.* (2007), através de uma revisão, mostram os diversos usos de xiloglucanas de tamarindo (*Tamarindus indica*) na liberação de alguns fármacos e suas vantagens quanto a outros sistemas de hidrogel.

Apesar de extensa revisão bibliográfica, não foram encontrados estudos relacionados às xiloglucanas estruturais de *Tamarindus indica* (tamarindo), mesmo levando-se em conta a importância econômica e seus possíveis usos. Neste trabalho, xiloglucanas estruturais e de reserva obtidas de folhas e sementes de tamarindo, respectivamente, foram isoladas, caracterizadas e comparadas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS SEMENTES DE *Tamarindus indica*

As sementes de *Tamarindus indica* (tamarindo) foram obtidas do IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, São Paulo).

#### 3.2 OBTENÇÃO DAS FOLHAS DE *Tamarindus indica*

As folhas de *Tamarindus indica* (tamarindo) foram coletadas e enviadas pelo IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, São Paulo).

#### 3.3 ISOLAMENTO DOS COTILÉDONES DAS SEMENTES E INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

Sementes de *Tamarindus indica* (tamarindo) foram submetidas à inativação enzimática por fervura em água destilada por aproximadamente 20 minutos. Após este processo, as sementes permaneceram por 24 a 48 h na água de fervura para entumescimento das mesmas, para facilitar a separação manual dos cotilédones. Os cotilédones secos foram moídos no moinho WILEY utilizando peneira de 2 mm. Os

cotilédones moídos e secos foram então submetidos à deslipidificação em aparelho extrator de Soxhlet, com tolueno-etanol (2:1), por aproximadamente 48 horas.

### 3.4 OBTENÇÃO DAS XILOGLUCANAS DE RESERVA DAS SEMENTES

Os cotilédones deslipidificados e secos foram submetidos à extração aquosa por 1 h, sob agitação mecânica, a temperatura ambiente (25°C) (KAI; PETKOWICZ, 2007; KAI; GABARDO; PETKOWICZ, 2008; KAI; PETKOWICZ, 2009). Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 RPM, 20°C, durante 20 min, separando-se o extrato do resíduo. O polissacarídeo foi então precipitado utilizando três volumes de etanol de grau de pureza comercial. O polissacarídeo obtido foi separado por centrifugação, 20°C, 10000 RPM, durante 20 minutos. O material precipitado foi lavado três vezes com etanol absoluto e então seco em estufa a vácuo. A fração resultante desta extração foi denominada XG1, representando o material obtido na extração aquosa dos cotilédones de tamarindo.

### 3.5 DESPIGMENTAÇÃO E DESLIPIDIFICAÇÃO DAS FOLHAS

As folhas de *Tamarindus indica* (tamarindo) foram secas em estufa no Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Em seguida foram moídas no moinho WILEY. Já moídas, foram despigmentadas com etanol comercial durante 170 h, em seguida secas ao ar. Após secagem foram deslipidificadas com tolueno:etanol (2:1) por aproximadamente 48 h, em aparelho extrator de Soxhlet. O resíduo foi seco ao ar e utilizado nas extrações.

### 3.6 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS FOLHAS

O resíduo despigmentado e deslipidificado (200 g) foi submetido a 5 extrações aquosas seqüenciais de 4 h, sob agitação mecânica, a 60 °C. Em seguida, os materiais foram centrifugados a 10000 RPM, 20°C, durante 20 min, separando-se o sobrenadante do resíduo. Os polissacarídeos foram então precipitados utilizando-se três volumes de etanol de grau de pureza comercial. Os polissacarídeos obtidos foram separados por centrifugação, 20°C, 10000 RPM, durante 20 minutos. Os materiais precipitados foram lavados três vezes com etanol absoluto e então secos em estufa a vácuo. A cada etapa de extração, o resíduo foi lavado duas vezes com água destilada, sendo a última a 60 °C, sendo o sobrenadante separado do resíduo por centrifugação e utilizado para dosagem pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), para verificação da presença de polissacarídeos no resíduo; no caso de presença positiva, uma nova extração foi feita. As frações resultantes destas extrações foram denominadas 1, 2, 3, 4 e 5 após a sigla EAF (extração aquosa das folhas). Assim EAF1 representará o material obtido na primeira extração aquosa das folhas de tamarindo.

A seguir o resíduo das extrações aquosas foi submetido à extração com EDTA 2% aquoso por 3 h a 25°C. O extrato foi separado do resíduo através de centrifugação a 10000 RPM, 20°C, durante 20 min. O resíduo foi lavado com água destilada. O sobrenadante foi dialisado por 72 h contra água corrente, depois concentrado e tratado com três volumes de etanol. O material precipitado foi separado por centrifugação e posteriormente lavado três vezes com etanol e seco em estufa a vácuo. A fração resultante desta extração foi denominada EEDTA, referindo-se ao método de extração ao qual foi submetido.

O resíduo da extração com EDTA foi submetido a sucessivas extrações alcalinas. Primeiramente com KOH 1M, com adição de NaBH<sub>4</sub>, durante 5 horas, por três vezes. A seguir, extraído com KOH 4M, com adição de NaBH<sub>4</sub>, durante 5 h, por três vezes. Em cada extração realizada, o resíduo foi lavado 2 vezes com água destilada, sendo esta adicionada ao extrato alcalino precedente. Após a centrifugação sob as



mesmas condições das extrações anteriores, os extratos alcalinos foram tratados com solução de ácido acético 50% (v/v) até pH 5,0, ocorrendo a precipitação das frações de hemicelulose A (HA), separadas por centrifugação, lavadas 4 vezes com etanol e secas em estufa a vácuo. As frações resultantes destas extrações foram denominadas HA1, HA2, HA3, HA4, HA5 e HA6, de acordo com a seqüência em que foram extraídas. Os sobrenadantes foram dialisados por 72 h contra água corrente, depois concentrados e tratados com etanol (3 volumes), ocorrendo a precipitação de hemicelulose B (HB) (WHISTLER; FEATHER, 1965). Estas frações foram centrifugadas, lavadas 3 vezes com etanol e secas em estufa a vácuo. As frações resultantes destas extrações foram denominadas HB1, HB2, HB3, HB4, HB5 e HB6, de acordo com a seqüência de extração.

O resíduo final resultante das extrações alcalinas foi lavado exaustivamente até a neutralidade, seco e armazenado para análises futuras, sendo denominado RF (resíduo final).

### 3.7 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

As dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando solução padrão de D-glucose em concentrações de 20-100  $\mu\text{g/mL}$  e leitura em comprimento de onda de 490 nm.

As dosagens de proteína foram realizadas pelo método de Hartree (HARTREE, 1972), utilizando solução padrão de soroalbumina bovina (BSA) em concentrações de 20-100  $\mu\text{g/mL}$  e leitura em comprimento de onda de 650 nm.

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas através do método de Filisetti-Cozzi e Carpita (FILISETTI-COZZI; CARPITA, 1991), tendo como solução

padrão ácido galacturônico em concentrações de 20-100  $\mu\text{g/mL}$  e leitura em comprimento de onda de 525 nm.

### 3.8 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

#### 3.8.1 Hidrólises ácidas totais

As hidrólises ácidas totais das frações obtidas das folhas e das sementes foram realizadas com TFA 2M, em banho de água fervente, por 5h. Ao final da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989).

A hidrólise ácida total do resíduo final das folhas foi efetuada de acordo com Saeman *et al.* (1954), em tubo hermeticamente fechado. Utilizou-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72 % (p/p), em banho de gelo durante duas horas, com agitações alternadas. Em seguida, diluiu-se para 8% e o material foi submetido a uma temperatura de 100 °C por aproximadamente 12 horas. Ao final da hidrólise o ácido sulfúrico foi neutralizado com carbonato de bário ( $\text{BaCO}_3$ ) e o sal resultante removido por filtração.

#### 3.8.2 Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise

Os monossacarídeos resultantes das hidrólises foram então reduzidos com boridreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), a 25°C (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Em seguida adicionou-se ao material resina catiônica Lewatit S-100 para a remoção dos íons sódio

(Na<sup>+</sup>) e para decompor o excesso do agente redutor. A seguir o material foi filtrado, evaporado até a secura e lavado três vezes com metanol para remoção do ácido bórico remanescente por co-destilação com metanol, na forma de triborato de metila. Após completa secura, os alditóis foram acetilados com anidrido acético – piridina (1:1 v/v) durante 24 h a temperatura ambiente (25°C) (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Esta reação foi interrompida com a adição de gelo moído e os alditóis acetatos extraídos com clorofórmio. A piridina residual na fase clorofórmica foi eliminada com sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% e água destilada de forma intercalada. A fase clorofórmica foi lavada diversas vezes com água destilada, evaporada a 25°C para posterior análise por cromatografia líquido-gasosa (GLC) dos derivados de acetatos de alditóis.

Para as análises de GLC utilizou-se um cromatógrafo TRACE GC ULTRA (THERMO ELECTRON CORPORATION), equipado com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2 mL/min. Foi utilizada uma coluna capilar [30m x 0,25mm (d.i.)] DB-225, com espessura de filme 0,25 µm, sendo a temperatura do detector 300°C e do injetor 250°C (SLONEKER, 1972).

### 3.9 PURIFICAÇÃO DAS XILOGLUCANAS DAS FOLHAS

Para purificar a fração HB4 foi utilizado um método cromatográfico, sendo este a cromatografia em coluna de troca-iônica DEAE-Trisacryl M Sigma D8157 (forma Cl<sup>-</sup>). O material neutro contendo a xiloglucana foi eluído com água destilada. O material obtido foi então concentrado, congelado e liofilizado. Uma parte do material foi dialisado por 72 h, em sistema fechado com água deionizada, sendo esta trocada todos os dias. O material dialisado foi precipitado com 3 volumes de etanol, em seguida lavado 3 vezes com etanol e seco em estufa a vácuo. Os materiais obtidos antes e após diálise foram denominados HB4C e HB4CD, respectivamente.

### 3.10 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER MULTIÂNGULOS (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV)

As amostras foram solubilizadas em concentração de 1-2mg/ml em solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 M contendo 200 ppm de  $\text{NaN}_3$  e então filtradas através de membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . As análises foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de ultravioleta (UV) UVICORD VW 2251 (PHARMACIA LKB) em comprimento de onda de 280nm, um detector de índice de refração (RI) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP, com 18 canais acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação Ultrahydrogel (WATERS) em série, com limites de exclusão de  $7 \cdot 10^6$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^4$  e  $5 \cdot 10^3$   $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . A fase móvel utilizada foi uma solução de  $\text{NaNO}_3$  0,1 M contendo  $\text{NaN}_3$  200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min, a 25°C, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515. Para análise dos dados foi utilizado o software ASTRA.

### 3.11 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE $^{13}\text{C}$

As frações HB4, HB4C e XG1 foram solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  e as análises efetuadas em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 foram obtidos no aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400 acoplado a um transformador Fourier, com ressonância para  $^{13}\text{C}$  de 100,3MHz, utilizando a temperatura de 70°C. Os deslocamentos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm, utilizando a ressonância dos grupos  $\text{CH}_3$  da acetona como padrão interno ( $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  30.2).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS FOLHAS DE TAMARINDO (*Tamarindus indica*)

As folhas de *Tamarindus indica* (tamarindo) foram secas, moídas, despigmentadas e deslipidificadas. Os tratamentos para despigmentação e deslipidificação promoveram uma redução de aproximadamente 29,3% da massa em relação ao material inicial.

Após a deslipidificação, o material seco foi submetido a cinco extrações sequenciais com: água a 60°C, durante 4 horas cada, EDTA 2% aquoso por 3 h a 25 °C, alcalinas com KOH a 1 e 4 M por 5 horas cada a 25°C, conforme demonstrado no fluxograma da Figura 7. O resíduo final foi lavado exaustivamente até a neutralidade, seco e armazenado para análises, sendo denominado RF (resíduo final).

Para a identificação das frações obtidas, foram utilizados os seguintes critérios: as frações resultantes das extrações aquosas receberam as letras EAF, correspondendo ao método de extração (extração aquosa) e material (folha) do qual foi obtido, seguidas da ordem de extração. Na extração feita com EDTA, a fração obtida recebeu as letras EEDTA, correspondendo ao método de extração. As frações obtidas por extrações alcalinas receberam a letra H (hemicelulose), seguida da letra "A" ou "B", correspondente ao tipo de hemicelulose obtido, seguida do número referente à ordem de extração. O resíduo final obtido após as extrações foi lavado com água até a neutralidade para posterior hidrólise.

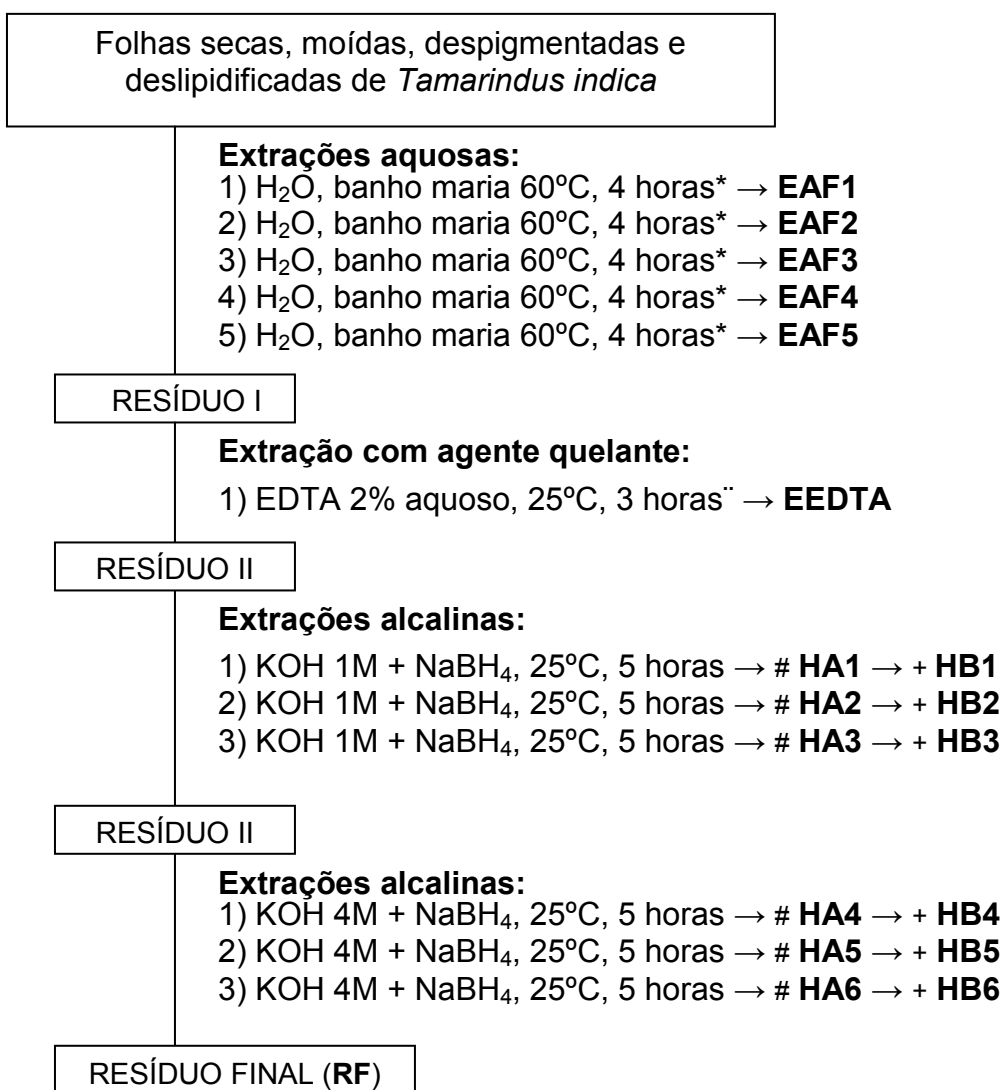


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE TAMARINDO  
**NOTA:** \*: CENTRIFUGAÇÃO, SEPARAÇÃO DO RESÍDUO PARA EXTRAÇÃO SEGUINTE E PRECIPITAÇÃO DO EXTRATO COM ETANOL.

<sup>ˆ</sup>: CENTRIFUGAÇÃO, SEPARAÇÃO DO RESÍDUO, LAVAGEM DO RESÍDUO COM ÁGUA DESTILADA, NOVA CENTRIFUGAÇÃO E SEPARAÇÃO DO RESÍDUO PARA A EXTRAÇÃO SEGUINTE

#: CENTRIFUGAÇÃO, SEPARAÇÃO DO RESÍDUO PARA EXTRAÇÃO SEGUINTE, NEUTRALIZAÇÃO DO EXTRATO E NOVA CENTRIFUGAÇÃO, OBTENDO-SE O PRECIPITADO (HA) E O SOBRENADANTE

+ : DIÁLISE DO SOBRENADANTE DA HA E PRECIPITAÇÃO DO EXTRATO COM ETANOL APÓS CONCENTRÁ-LO

Na Tabela 1 está indicado o rendimento e os conteúdos de açúcar total e proteína das frações polissacarídicas obtidas.

Todas as frações apresentaram rendimentos relativamente baixos, conforme esperado para material de parede celular. Entre as frações obtidas por extração alcalina, HA1 apresentou o maior rendimento (7,1%), seguida por HA4 (3,8%), ambas obtidas com KOH 1M, e HB2 (1,8%), obtida com KOH 4M. Na maioria das frações alcalinas, o rendimento das hemiceluloses A foi superior ao das hemiceluloses B, sugerindo o predomínio de polissacarídeos de baixa massa molar.

Em geral, os teores de açúcar total também foram baixos, exceto na fração HA2 (81,7%), obtida por extração com KOH 1M. Entretanto estes valores podem estar subestimados devido à utilização de um padrão que não representa a composição da amostra, uma vez que se sabe que o método é sensível ao tipo de açúcar utilizado como padrão. Entre as hemiceluloses B, a fração que apresentou o maior conteúdo de açúcar total foi a HB6, obtida por extração com KOH 4M.

Os teores de proteína, em contrapartida, na maioria das amostras foram elevados, variando de 5% a 85%, sendo a fração HA1, obtida com KOH 1M, a que apresentou maior conteúdo protéico. Esta fração apresentou 22% de açúcar total e é a fração com maior rendimento.

Os teores elevados de proteína determinados podem estar superestimados, conforme observado na fração HA1 (85,8%), uma vez que o método sofre interferência de compostos fenólicos, que reagem com o reagente Folin-Ciocalteu utilizado no método colorimétrico (HARTREE, 1972). Estes compostos podem ter sido extraídos pela utilização de uma extração em condição mais “drástica” comparando-se com as extrações anteriores, que apresentaram teores de proteínas mais baixos. Pode-se verificar que a fração HA1, por exemplo, apresenta mais de 100% na somatória das dosagens de açúcar total e proteínas, sendo necessário realizar posteriormente uma nova dosagem de proteínas utilizando-se outro método colorimétrico.

**TABELA 1** – RENDIMENTO, AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNAS DAS EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE TAMARINDO

FRAÇÕES	RENDIMENTO <sup>a</sup> % (m/m)	AÇÚCAR TOTAL <sup>b</sup> (%)	PROTEÍNAS <sup>c</sup> (%)
EAF1	3,3	6,6	14,7
EAF2	1,5	10,7	12,9
EAF3	0,5	11,5	10,2
EAF4	0,2	11,8	6,8
EAF5	0,1	20,6	5,4
EEDTA	0,2	11,0	5,5
HA1	7,1	22,2	85,8
HA2	0,5	81,7	42,3
HA3	0,9	27,7	59,3
HA4	3,8	11,5	34,9
HA5	1,6	13,5	34,5
HA6	0,3	24,1	48,5
HB1	1,5	35,4	64,2
HB2	1,8	20,0	75,8
HB3	1,4	22,7	69,8
HB4	1,2	22,3	65,5
HB5	0,6	34,9	46,8
HB6	0,5	45,1	38,3

NOTA: (a): EM RELAÇÃO AOS COTILÉDONES DESLIPIDIFICADOS (g%)

(b): DETERMINADO POR DUBOIS *et al.* (1956)

(c): DETERMINADO POR HARTREE (1972)

Na Tabela 2 observa-se a composição monossacarídica das frações obtidas a partir das folhas de tamarindo (*T. indica*), mostrando que as frações extraídas com água e EDTA 2% são ricas em ácido urônico, galactose e arabinose, sugerindo a presença de pectinas. Busato, Vargas-Rechia, Reicher (2001) também encontraram amostras ricas em ácido urônico, galactose e arabinose em extrações com água e EDTA 2% de folhas de jatobá (*Hymenaea courbaril*). Nas frações alcalinas correspondentes às hemiceluloses A (HA), exceto HA1, verifica-se que a xilose é o monossacarídeo



majoritário, sugerindo a presença de xilanas nestas frações (aproximadamente ou superior a 50% de xilose).

**TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE TAMARINDO**

Amostra	MONOSSACARÍDEOS <sup>a</sup>							
	(mol%)							
	Ramnose	Fucose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose	A. Urônicos <sup>b</sup>
EAF1	14,8	-	27,9	-	3,6	38,5	15,2	14,4
EAF2	5,9	-	33,0	3,9	3,7	39,8	13,6	12,8
EAF3	6,5	-	56,7	5,6	2,0	22,5	6,7	10,3
EAF4	7,1	-	47,7	5,2	1,5	31,0	7,5	6,8
EAF5	5,6	1,8	59,0	4,0	1,7	23,8	4,2	5,3
EEDTA	-	-	25,6	-	-	51,9	22,5	5,5
HA1	1,8	2,0	53,3	16,2	3,2	15,5	8,1	15,3
HA2	0,4	-	3,4	93,1	0,2	1,0	1,9	5,7
HA3	1,0	0,6	3,3	91,2	0,4	0,8	2,8	0,3
HA4		2,9	17,0	70,4	1,9	3,9	3,9	0,0
HA5	1,7	2,0	28,6	49,5	3,8	7,9	6,6	0,0
HA6	0,8	1,1	22,9	57,8	4,4	8,6	4,4	0,0
HB1	9,6	2,6	24,2	6,5	10,7	28,5	17,9	20,7
HB2	4,7	2,4	25,8	25,5	3,1	18,7	19,8	9,1
HB3	1,8	3,5	17,6	31,9	1,2	20,2	23,9	5,9
HB4	2,3	5,8	13,8	25,0	2,6	13,9	36,6	5,3
HB5	4,0	2,4	25,9	23,1	7,6	13,0	24,0	6,9
HB6	4,9	3,5	29,6	20,9	5,1	13,1	23,0	8,6
RF	4,4	5,6	20,6	38,1	2,6	6,0	22,7	ND

NOTA: (a): MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DETERMINADOS POR GLC

(b): DETERMINADO POR FILISETTI-COZZI E CARPITA (1991)

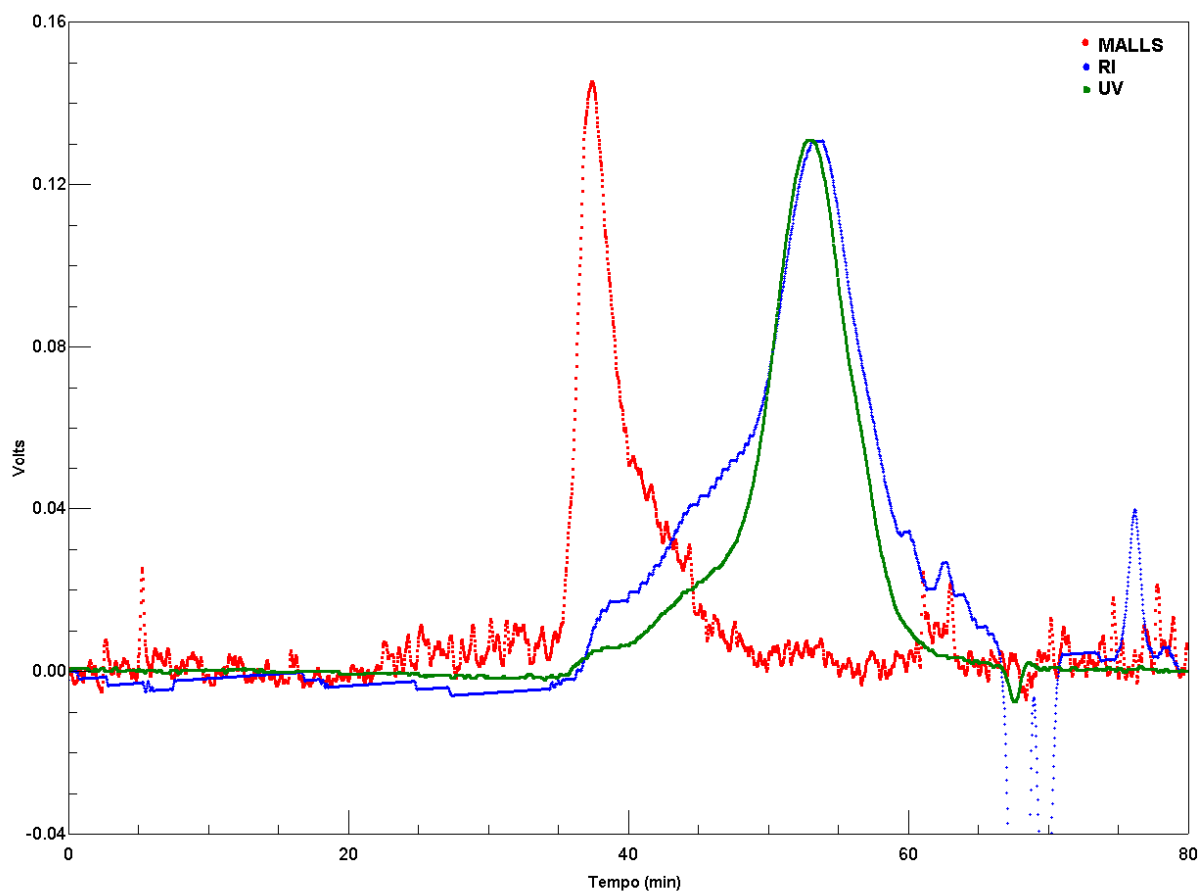
ND: NÃO DETERMINADO

Todas as frações foram analisadas por HPSEC-MALLS/RI (dados não mostrados) e apresentaram uma distribuição de massa polimodal, com dois ou mais picos, indicando serem heterogêneas. Estes dados serão apresentados posteriormente para a fração selecionada para purificação.

O resíduo final (RF) obtido após as extrações aquosas, com EDTA e alcalinas foi composto principalmente por xilose e glucose. Além disso, foram detectados: galactose, manose, arabinose, ramnose e fucose. Os resultados obtidos sugerem que o resíduo final insolúvel, além de celulose, ainda contém outros polissacarídeos, inclusive xiloglucanas fucosiladas.

A fração obtida com KOH 4M, HB4, apesar de não apresentar o maior rendimento entre as extrações (1,2%), na composição monossacarídica apresentou fucose em maior porcentagem dentre as frações de HB, sendo por esta razão escolhida para se tentar isolar uma xiloglucana estrutural. As xiloglucanas estruturais normalmente são isoladas a partir das frações de hemicelulose B (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; FRY, 1989).

O perfil de eluição da fração HB4, utilizando detectores de espalhamento de luz (MALLS), índice de refração (RI) e ultravioleta (UV) está mostrado na Figura 8.



**FIGURA 8** – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO HB4 OBTIDA DE FOLHAS DE TAMARINDO, COM DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV)

É possível observar que a amostra HB4 não é homogênea. O detector de espalhamento de luz apresenta um único pico de grande intensidade eluindo aos 40

minutos, sendo este detectado com baixa intensidade pelo índice de refração. No perfil de eluição obtido pelo índice de refração, observam-se dois picos, não coincidentes com o espalhamento de luz. O primeiro pico apresenta vários “ombros”, ou seja, o pico não é simétrico, o que sugere a presença de outras populações de polímeros. O detector de ultravioleta ( $\lambda$  280nm) apresenta um pico pronunciado, não simétrico, provavelmente devido à presença de proteína na amostra. Estes resultados estão de acordo com os dados de dosagem colorimétrica onde a amostra apresenta 65,5% de proteínas. A detecção pelo ultravioleta é coincidente com o índice de refração, podendo sugerir a presença de uma fração em que a proteína está ligada ao polissacarídeo.

Na tentativa de purificar a fração HB4 e isolar uma xiloglucana estrutural, empregou-se uma coluna de cromatografia de troca iônica contendo DEAE-Trisacryl M. Este método foi escolhido baseado em protocolos anteriores utilizados no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001). Para acompanhar o processo de purificação, utilizou-se o método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). A fração eluída com água da coluna foi concentrada, congelada e liofilizada, sendo denominada HB4C (coluna).

A Tabela 3 compara a composição monossacarídica da fração HB4 com a fração HB4C.

**TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HB4 E HB4C OBTIDAS DE FOLHAS DE TAMARINDO**

<b>MONOSSACARÍDEOS<sup>a</sup></b>								
<b>(mol%)</b>								
Amostra	Ramnose	Fucose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose	A. Urônicos <sup>b</sup>
HB4 <sup>c</sup>	2,3	5,7	13,7	24,9	2,6	13,7	36,4	5,3
HB4C	-	2,5	1,9	17,9	4,5	15,2	58,0	1,9

NOTA: (a): MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DETERMINADOS POR GLC

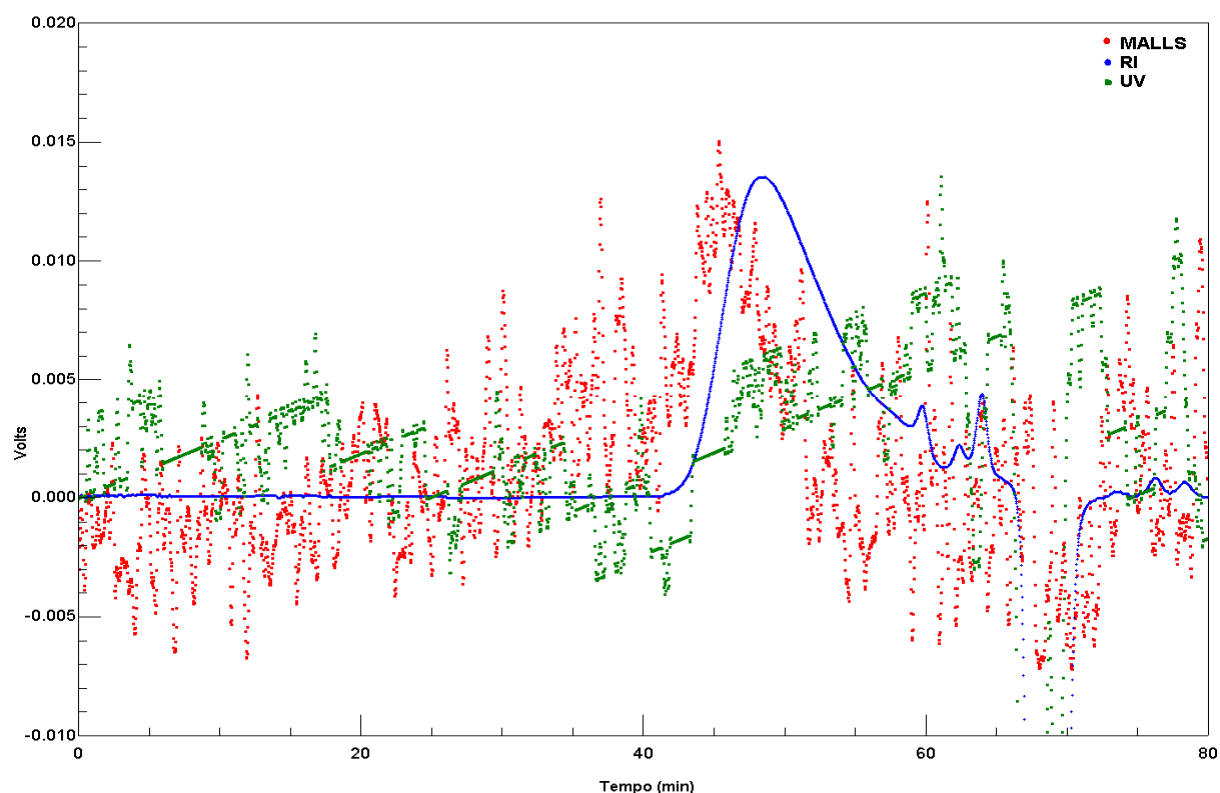
(b): DETERMINADO POR FILISETTI-COZZI E CARPITA (1991)

(c): AMOSTRA ORIGINAL

A composição monossacarídica da fração HB4C indica que nem todo o componente ácido foi removido na cromatografia de troca iônica. Embora os monossacarídeos característicos de xiloglucanas estruturais estejam presentes na amostra, pequenas proporções de Ara e Man foram detectadas. Busato, Vargas-Rechia

e Reicher (2001) isolaram e caracterizaram uma xiloglucana estrutural das folhas de *Hymenaea courbaril* (jatobá) e também observaram a presença de pequenas proporções de Ara e Man. Paredes (2009) também detectou a presença dos mesmos componentes em material proveniente de “farinha de maca” (*Lepidium meyenii*). O conteúdo de Glc está de acordo com o esperado para uma xiloglucana.

Na Figura 9 pode-se observar o perfil de eluição da fração HB4C, onde se observa um pico proeminente detectado pelo índice de refração. A detecção do RI ainda mostra a presença de alguns “ombros”.

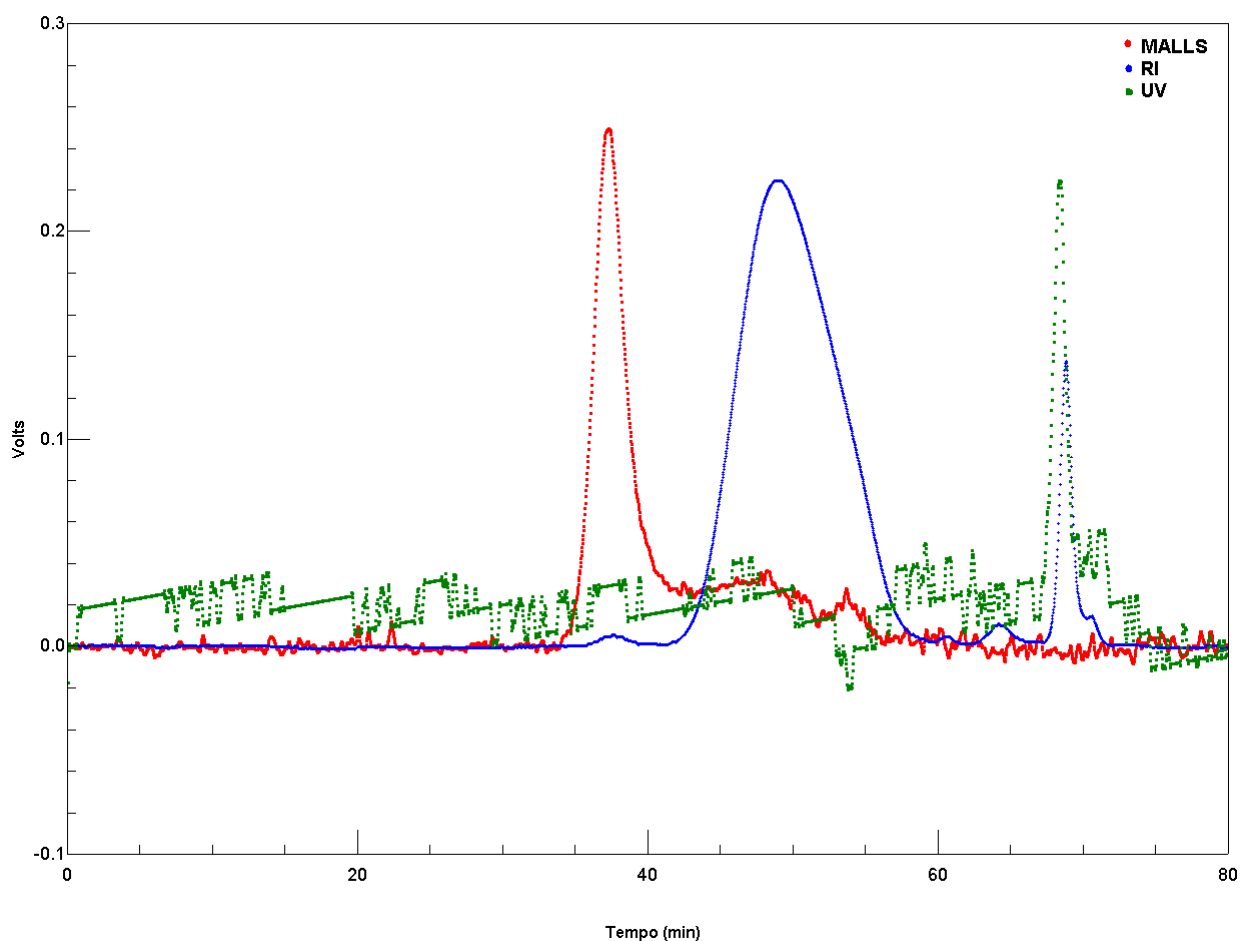


**FIGURA 9** – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO HB4C OBTIDA DE FOLHAS DE TAMARINDO, COM DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV)

Os ombros apresentados no índice de refração podem indicar a presença de compostos de baixa massa. Para realizar essa remoção, a fração foi solubilizada em água e dialisada pelo período de 72 horas, em sistema fechado com água deionizada, sendo esta trocada diariamente. A amostra foi tratada com 3 volumes de etanol,

posteriormente lavada 3 vezes com etanol e seca em estufa a vácuo. A fração foi denominada HB4CD (diálise).

Na Figura 10 pode-se observar o perfil de eluição da fração HB4CD, que apresenta um pico proeminente detectado pelo índice de refração e espalhamento de luz. A detecção pelo RI ainda mostra a presença de outros pequenos picos, entretanto o pico com maior intensidade não apresenta “ombros”, assim verifica-se que o processo de troca iônica foi eficiente na remoção da proteína e outros polissacarídeos e a diálise eficiente para a remoção de contaminantes de baixa massa presentes na amostra.



**FIGURA 10** – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO HB4CD OBTIDA DE FOLHAS DE TAMARINDO, COM DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV)

As frações HB4 e HB4C foram analisadas por RMN-<sup>13</sup>C e os espectros obtidos estão mostrados nas Figuras 11 e 12.

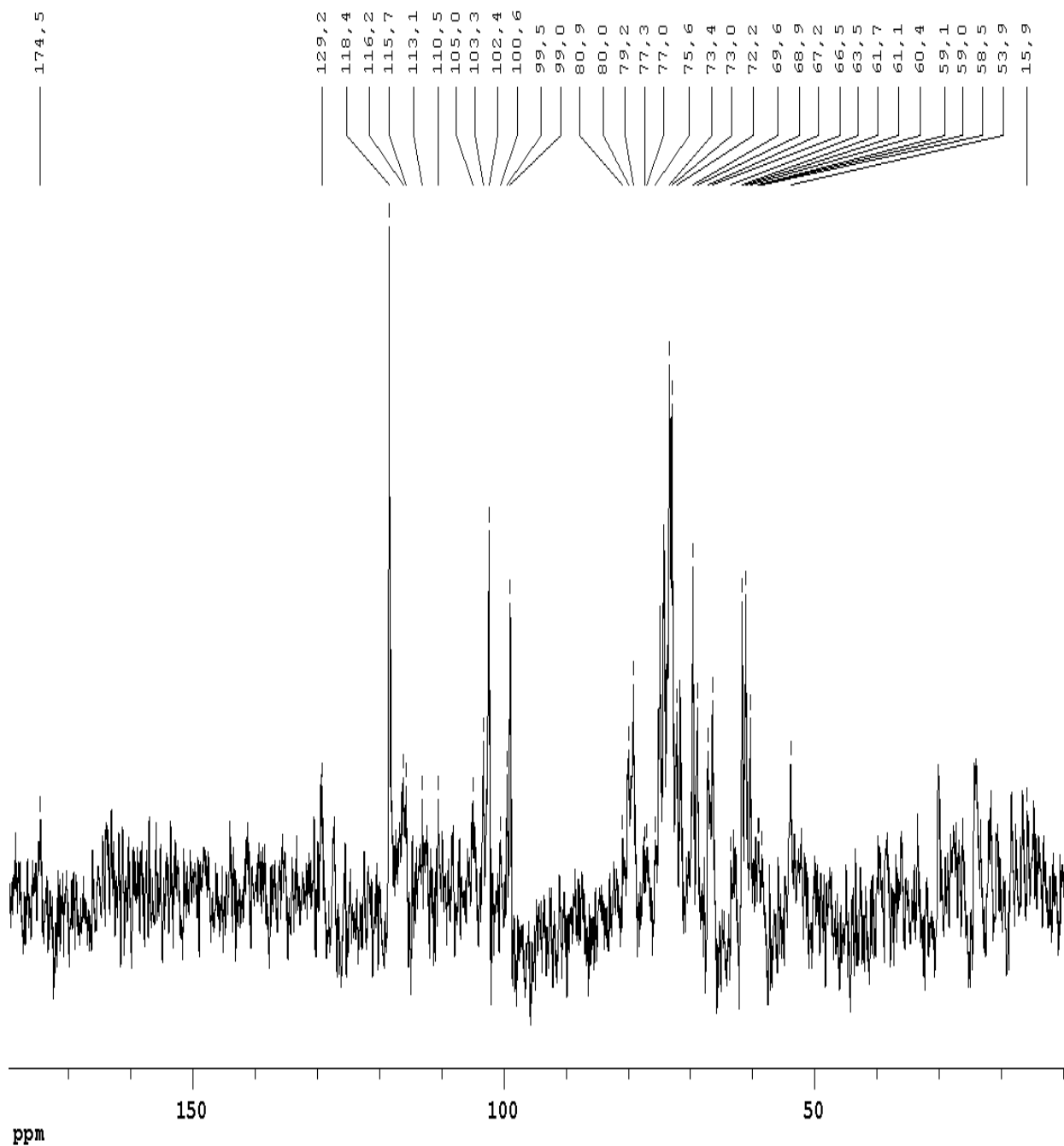
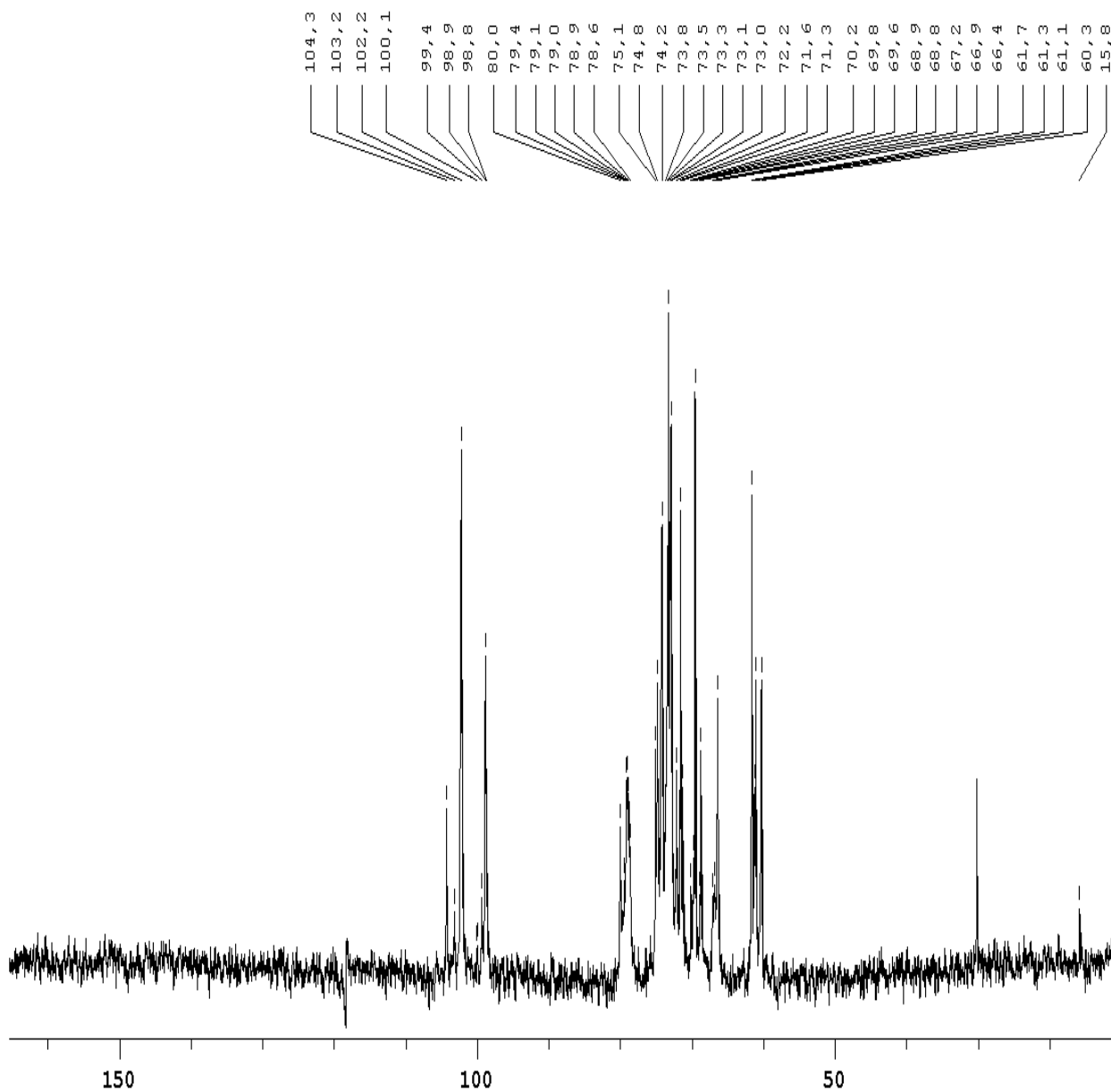


FIGURA 11 – ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA AMOSTRA HB4 EM D<sub>2</sub>O A 70°C



**FIGURA 12** – ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA AMOSTRA HB4C EM  $\text{D}_2\text{O}$  A  $70^\circ\text{C}$

O espectro da fração HB4 apresenta grande quantidade de sinais, indicando a complexidade estrutural da amostra. O espectro da amostra purificada, HB4C, demonstra que o processo de purificação foi relativamente eficiente.

A região anomérica do espectro da fração HB4C apresenta sinais característicos de uma xiloglucana estrutural (BUCHALA *et al.*, 1993; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; CHAMBAT; BARNOUD; JOSELEAU, 1984), conforme mostrado na Tabela 4. As atribuições dos sinais da região anomérica de espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração HB4C concordam com os dados da composição monossacarídica, que demonstram a presença de uma xiloglucana estrutural na fração referentes a hemicelulose B, obtida por extração alcalina.

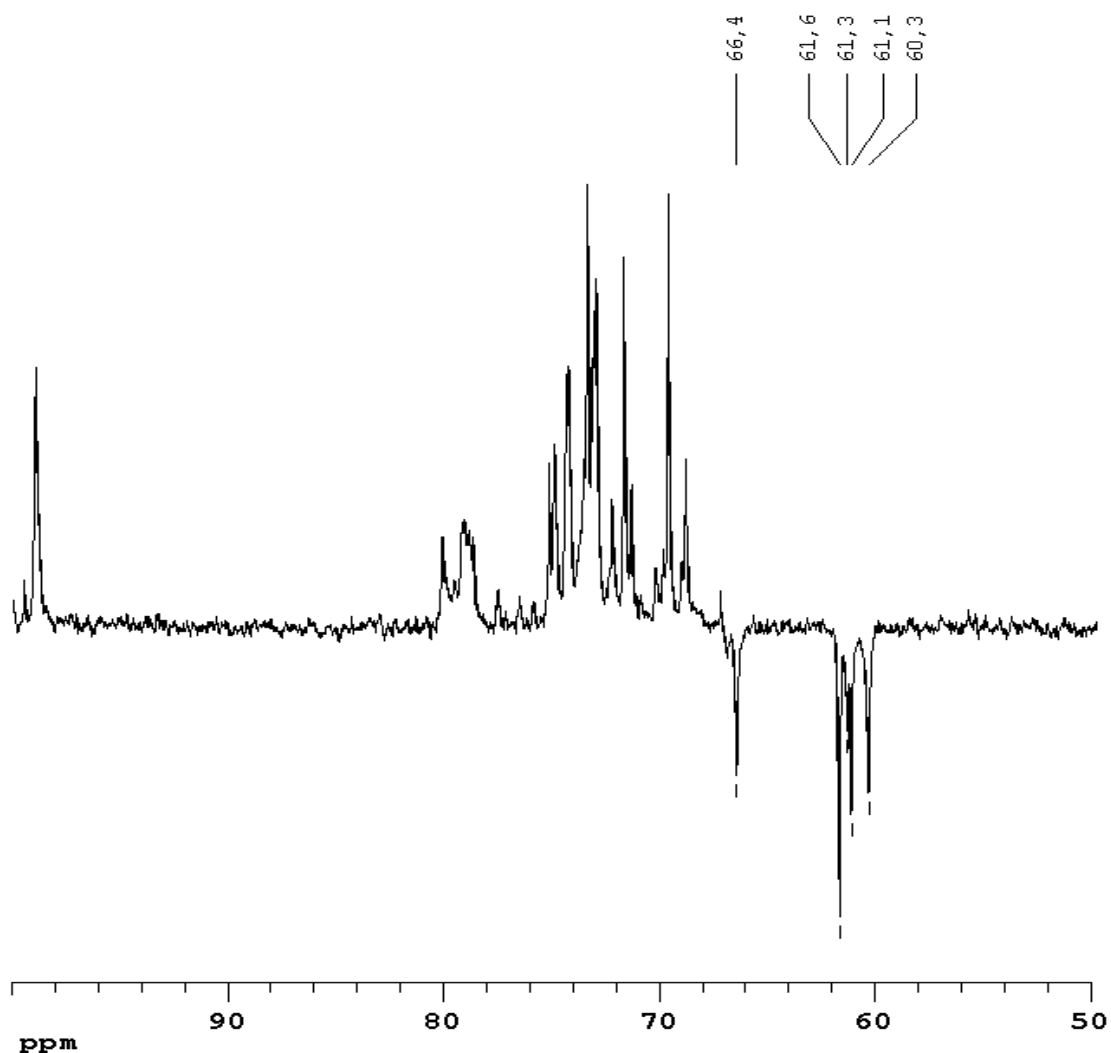
**TABELA 4** – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) DA REGIÃO ANOMÉRICA DA XILOGLUCANA PRESENTE NAS FRAÇÃO HB4C

<b>UNIDADE MONOMÉRICA (C-1)</b>	<b><math>\delta</math> (PPM)</b>
$\beta$ -D-galactose terminal	104,3
$\beta$ -D-galactose substituída	103,2
$\beta$ -D-glucose	102,2
$\alpha$ -L-fucose	100,1
$\alpha$ -D-xilose terminal	99,4
$\alpha$ -D-xilose substituída	98,9

É possível distinguir outros sinais típicos de xiloglucanas da amostra HB4C. O sinal em 60,3 ppm e 61,1 ppm foram atribuídos ao C-6 livre das unidades de Gal terminal e substituídas, respectivamente. O sinal em 66,4 ppm foi atribuído ao C-6 substituído das unidades de Glc e o sinal 61,7 ppm ao C-5 das unidades de Xyl. (BUCHALA *et al.*, 1993; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; JOSELEAU; CHAMBAT, 1984). Estes sinais foram atribuídos através da realização do experimento de DEPT-135, que resulta na inversão dos sinais de CH<sub>2</sub>, conforme demonstrado na Figura 13.

O sinal em campo alto, em 15,8 ppm foi atribuído ao grupo metil das unidades de fucose.





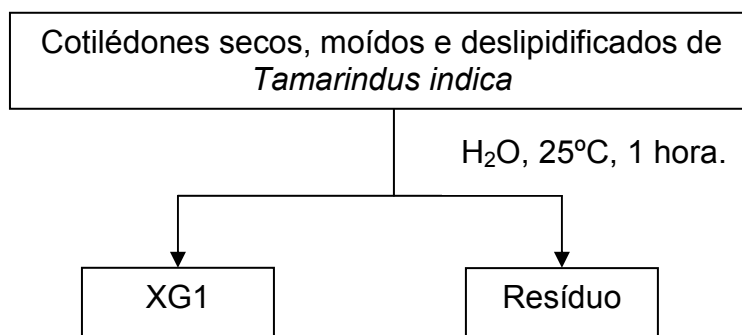
**FIGURA 13** – ESPECTRO DE DEPT-135 DA AMOSTRA HB4C EM D<sub>2</sub>O A 70°C

#### 4.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS COTILÉDONES DE SEMENTES DE TAMARINDO (*Tamarindus indica*) E COMPARAÇÃO COM OS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA FOLHA DE TAMARINDO

Para poder comparar as xiloglucanas estruturais e de reserva, foi feita uma extração aquosa utilizando-se os cotilédones de tamarindo. Inicialmente, as sementes de *Tamarindus indica* (tamarindo) foram submetidas à inativação enzimática por

fervura, e após separação manual dos cotilédones, estes foram secos, moídos e deslipidificados. O tratamento de deslipidificação promoveu uma redução de aproximadamente 11,6% da massa em relação ao material inicial.

Após a deslipidificação, o material seco foi submetido a uma extração aquosa, a 25°C, durante 1 hora (KAI e PETKOWICZ, 2007; KAI, GABARDO e PETKOWICZ, 2008; KAI; PETKOWICZ, 2009), conforme o fluxograma apresentado na Figura 14. A fração resultante desta extração foi denominada XG1, representando o material obtido na extração aquosa dos cotilédones de tamarindo.



**FIGURA 14** – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE XILOGLUCANA DE COTILÉDONES DE TAMARINDO

A análise da composição monossacarídica da fração obtida (XG1) (Tabela 5) mostrou a presença de glucose como componente majoritário, seguido de xilose e galactose, sugerindo a presença de xiloglucanas. As proporções apresentadas estão de acordo com as proporções encontradas na literatura (GIDLEY *et al.*, 1991; FREITAS *et al.*, 2005). A amostra apresentou pequena quantidade de arabinose em sua composição monossacarídica (4,2%), o que já foi reportado anteriormente em extrações aquosas de sementes de *Hymenaea courbaril*, *Tamarindus indica*, *Dentarium senegalense* e *Azelia africana* (GIDLEY *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1996; FREITAS *et al.*, 2005, REN *et al.*, 2005). Pequenas quantidades de arabinose em frações polissacarídicas contendo xiloglucana tanto de reserva como estrutural é bastante comum. Acredita-se que a arabinose seja um contaminante, uma vez que nenhum oligossacarídeo contendo arabinose foi isolado de *Hymenaea courbaril*, *Tamarindus indica* e *Dentarium senegalense* (LIMA *et al.*, 1993, 1995; WANG *et al.*, 1996; VINCKEN

*et al.*, 1997; SIMS *et al.*, 1998; ONWELUZO, RAMESH, THARANATHAN, 2002; TINÉ *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2005). KAI e PETKOWICZ (2007) demonstraram que em extrações aquosas de sementes de jatobá, as frações obtidas com 15 min e 30 min de extração não apresentaram contaminação por arabinose, sugerindo que estes tempos curtos de extração resultam em frações com alto grau de pureza, mas com baixos rendimentos.

Na Tabela 5 observa-se a composição monossacarídica das frações HB4C e XG1, obtidas de extrações alcalinas de folhas e aquosas de sementes de tamarindo, respectivamente.

**TABELA 5 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO HB4C E XG1, OBTIDAS DE FOLHAS E SEMENTES DE TAMARINDO, RESPECTIVAMENTE**

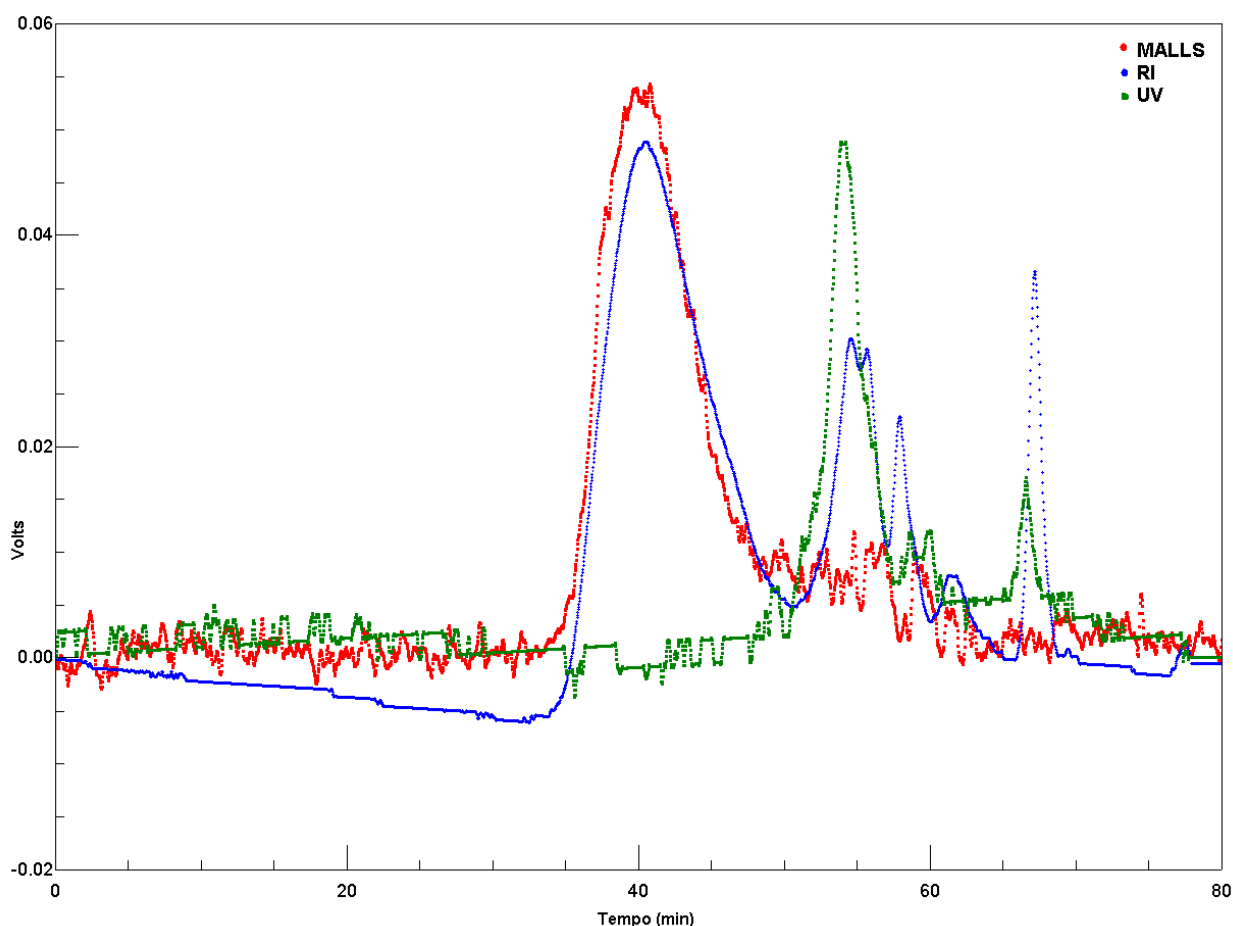
<b>MONOSSACARÍDEOS<sup>a</sup></b>							
<b>(mol %)</b>							
Amostra	Ramnose	Fucose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose
HB4C	-	2,5	1,9	17,9	4,5	15,2	58,0
XG1	Tr	-	4,2	26,0	3,3	19,1	47,1

**NOTA:** (a): MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DETERMINADOS POR GLC  
Tr: TRAÇOS

Comparando-se a composição da fração obtida por extração alcalina de folhas de tamarindo e posteriormente purificada com a fração obtida por extração aquosa de cotilédones de tamarindo, as frações apresentam semelhanças quanto ao alto teor de glucose, xilose e galactose, indicando a presença de xiloglucanas. Mas a principal diferença entre as frações é a presença de fucose (2,5%) na amostra HB4C, obtida das folhas de tamarindo, o que indica neste caso a presença de xiloglucana fucosilada. A composição monossacarídica das frações HB4C e XG1 sugerem que as xiloglucanas estruturais, ou seja, de parede primária, são estruturalmente diferentes do polissacarídeo de reserva, sendo a diferença principal a presença de fucose no primeiro caso.

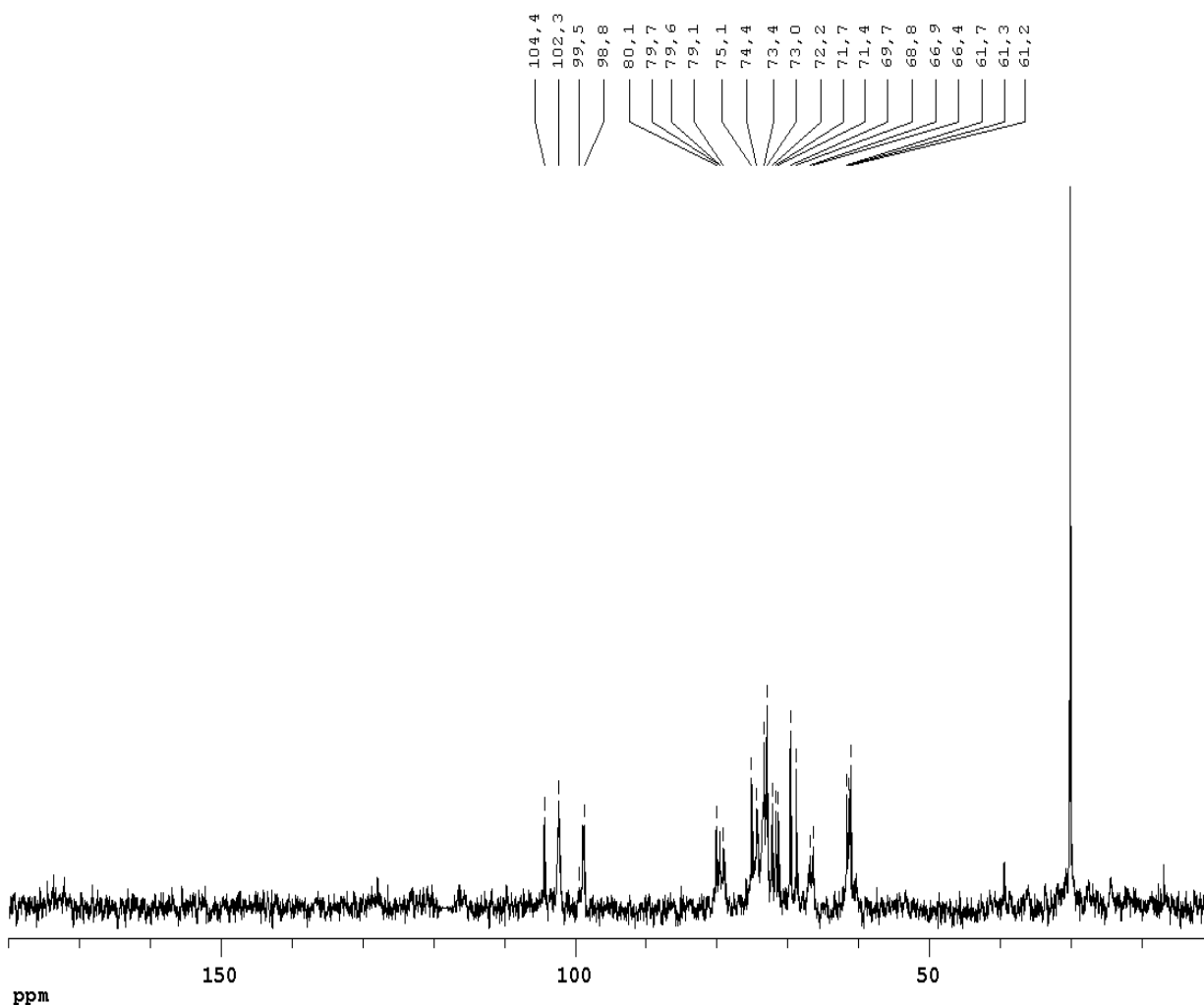
O perfil de eluição da fração XG1 por HPSEC, utilizando detectores de espalhamento de luz (MALLS), índice de refração (RI) e ultravioleta (UV) está mostrado

na Figura 15. Pode-se verificar que a fração XG1 apresentou no detector de espalhamento de luz um único pico de grande intensidade eluindo aos 40 minutos. No perfil de eluição obtido pelo índice de refração, observa-se um pico principal de alta intensidade coincidente com o obtido pelo espalhamento de luz, o que mostra a presença do polissacarídeo. O detector de espalhamento de luz também apresenta outros picos eluindo após os 40 minutos, o que mostra a presença de polissacarídeos de baixa massa na amostra. O detector de ultravioleta ( $\lambda$  280nm) apresenta alguns picos, provavelmente devido à possível presença de proteínas e outros polímeros na amostra.



**FIGURA 15** – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO XG1 OBTIDA DE COTILÉDONES DE TAMARINDO, COM DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (MALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA (UV)

A fração XG1 foi analisada por RMN-<sup>13</sup>C e o espectro obtido está mostrado na Figura 16.



**FIGURA 16** – ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA AMOSTRA XG1 EM D<sub>2</sub>O A 70°C

As atribuições dos sinais da região anomérica de espectro de RMN-<sup>13</sup>C das xiloglucanas presentes nas frações HB4C e XG1 estão indicadas na Tabela 6. Para a fração XG1, a região anomérica do espectro apresenta sinais característicos de uma xiloglucana de reserva (LIMA *et al.*, 1993; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001). Em análise de espectro de RMN-<sup>13</sup>C de xiloglucana de sementes de tamarindo, GIDLEY *et al.* (1991) observaram sinais de C-1 em 105,5 ppm, 103,4 ppm e 100,1 ppm para as unidades de galactose, glucose e xilose, respectivamente, próximos aos encontrados na amostra XG1. É possível distinguir outros sinais típicos de xiloglucanas (BUCHALA *et al.*, 1993; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; JOSELEAU; CHAMBAT, 1984). O sinal em 61,2 ppm foi atribuído ao C-6 livre das unidades de Gal.

O sinal em 66,4 ppm foi atribuído ao C-6 substituído das unidades de Glc e o sinal 61,7 ppm ao C-5 das unidades de Xyl. Estas atribuições foram confirmadas pelo experimento de DEPT-135 que resulta na inversão dos sinais de CH<sub>2</sub>, conforme demonstrado na Figura 17.

Comparando-se as atribuições dos sinais da região anomérica de espectro de RMN-<sup>13</sup>C das xiloglucanas presentes nas frações HB4C e XG1 (Tabela 6), podemos observar que a fração obtida da folha de tamarindo (HB4C) apresenta os sinais em 103,2 ppm e 100,1 ppm atribuídos a β-D-galactose substituída e α-L-fucose, respectivamente, ausentes na fração obtida da semente de tamarindo (XG1), corroborando o que foi sugerido pela composição monossacarídica de ambas as amostras, ou seja, que estruturalmente a xiloglucana estrutural difere da xiloglucana de reserva pela substituição em O-2 das unidades de galactose por unidades de fucose, sendo assim compatíveis com as funções que apresentam. Busato, Vargas-Rechia e Reicher (2001), ao comparar espectros de RMN-<sup>13</sup>C de folhas de *Hymenaea courbaril* com os espectros de xiloglucanas da semente presentes na literatura (LIMA *et al.*, 1993), observaram estas mesmas diferenças, ou seja, a xiloglucana de semente apresentava ausência de sinais para β-D-galactose substituída e α-L-fucose, ambos presentes na xiloglucana das folhas.

A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que as xiloglucanas estruturais (folhas) e de reserva (sementes) de tamarindo diferem principalmente pela presença de fucose nas cadeias laterais do polissacarídeo, o que pode influenciar na conformação da molécula e na interação com as microfibrilas de celulose.

**TABELA 6** – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS XILOGLUCANAS PRESENTES NAS FRAÇÕES XG1 E HB4C

<b>UNIDADE MONOMÉRICA (C-1)</b>	<b>XG1 - δ (PPM)</b>	<b>HB4C - δ (PPM)</b>
β-D-galactose terminal	104,4	104,3
β-D-galactose substituída	-	103,2
β-D-glucose	102,3	102,2
α-L-fucose	-	100,1
α-D-xilose terminal	99,5	99,4
α-D-xilose substituída	98,8	98,9

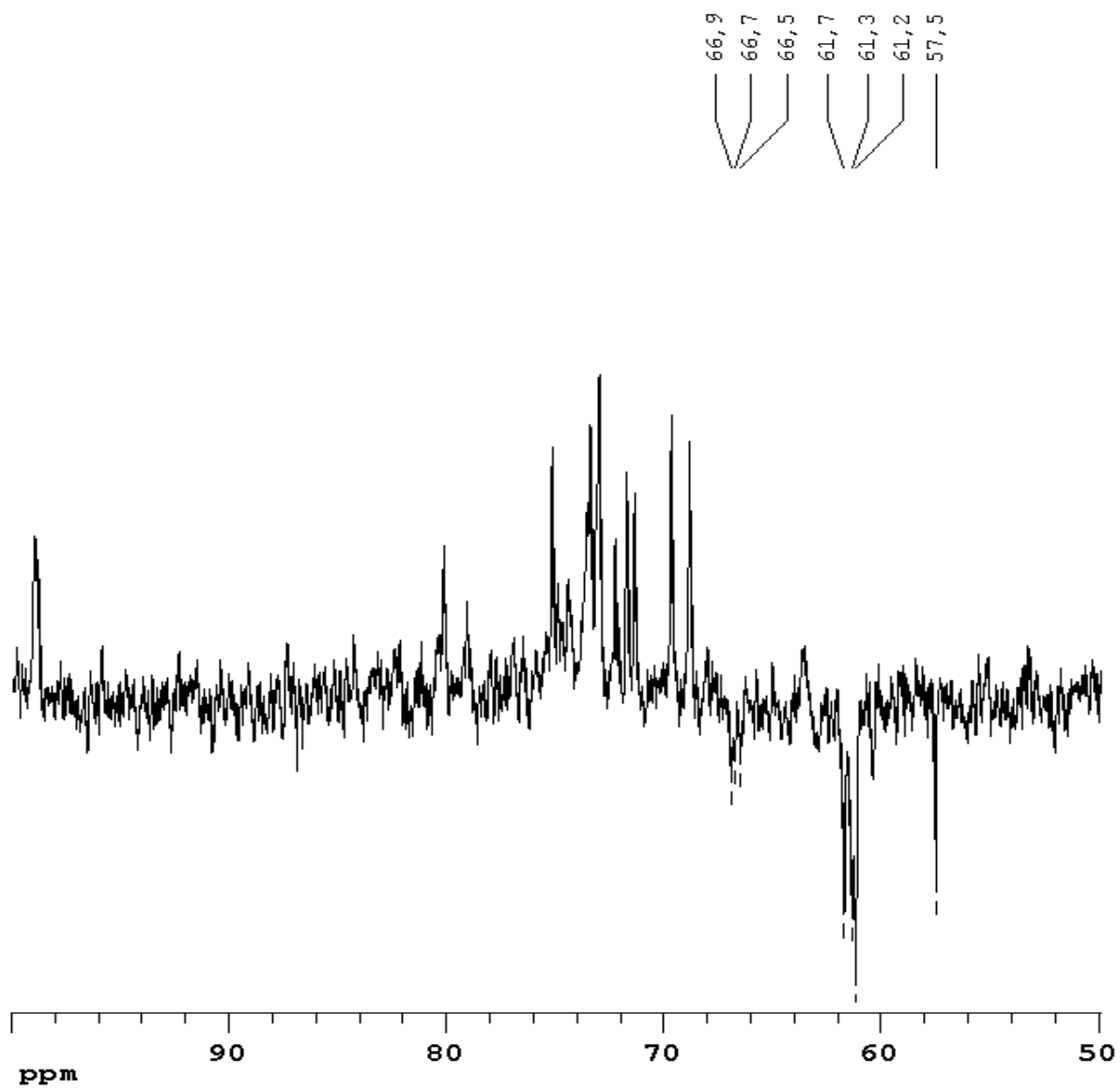


FIGURA 17 – ESPECTRO DE DEPT-135 DA AMOSTRA XG1 EM D<sub>2</sub>O A 70°C

## 5 CONCLUSÕES

A partir das folhas secas, moídas, despigmentadas e deslipidificadas de tamarindo (*Tamarindus indica*) foram obtidas frações contendo pectinas e hemiceluloses. As extrações aquosas a quente e com EDTA 2% aquoso solubilizaram principalmente pectinas, enquanto que as frações obtidas por extrações alcalinas apresentaram-se constituídas por hemiceluloses.

A fração HB4, escolhida para obtenção de xiloglucana estrutural, foi purificada utilizando cromatografia de troca iônica, obtendo-se a fração HB4C. Através do perfil de eluição e dosagem colorimétrica de ácido urônico, pode-se verificar que a purificação foi efetiva quanto aos açúcares ácidos e proteínas, mas a amostra ainda não se mostrou homogênea.

A composição monossacarídica das amostras mostrou que a extração com álcali foi efetiva na obtenção de xiloglucana estrutural da folha de tamarindo, dados corroborados pela análise de RMN-<sup>13</sup>C e DEPT-135.

A partir dos cotilédones inativados, secos, moídos e deslipidificados de tamarindo (*Tamarindus indica*) foi obtida uma fração (XG1) contendo xiloglucana de reserva por extração aquosa, conforme observado pela composição monossacarídica.

Ao se comparar as amostras HB4C e XG1, pode-se observar que a composição monossacarídica difere entre elas, uma vez que na amostra HB4C observa-se a presença de fucose. Esses dados são confirmados pela análise de espectro de RMN-<sup>13</sup>C e DEPT-135 das amostras, uma vez que na amostra XG1 há a ausência dos sinais para  $\beta$ -D-galactose substituída e  $\alpha$ -L-fucose, ambos presentes na xiloglucana de folhas.

Os resultados obtidos sugerem que a principal diferença entre xiloglucanas estruturais e de reserva obtidas das folhas e sementes de tamarindo, é a presença de fucose nas cadeias laterais do polissacarídeo, o que pode significar mudanças na conformação da molécula e provavelmente na interação com as microfibrilas de celulose.



## REFERÊNCIAS

<[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Tamarind\\_pods\\_edible\\_part.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Tamarind_pods_edible_part.jpg)>  
Acesso em 30/06/2009.

ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in Carbohydrates Chemistry**, v.5, p. 269-276, 1965.

ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. **Scient. Am.**, v. 232, p. 80-94, 1975.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates. In: DEY, P. M. HARBONE, J. B. **Plant Biochemistry**. Academic Press, San Diego, p. 143-204, 1997.

AUGUR, C.; YU, L.; SAKAI, K.; OGAWA, T.; SINAY, P.; DARVILL, A.G.;  
ALBERSHEIM, P. Further studies of ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-stimulated growth. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 180-185, 1992.

BHATTACHARYA, S.; BAL, S.; MUKHERJEE, R. K.; BHATTACHARYA, S. Some physical and engineering properties of tamarind (*Tamarindus indica*) seed. **Journal of Food Engineering**, v. 18, p. 77-89, 1993.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C.J., MCGINNIS, G.D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. p. 27-41.

BOCHICCHIO, R. **Aspectos estruturais, interações e dinâmica de crescimento da parede celular de caules de gimnospermas nativas**. Curitiba, 2003. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BUCHALA, A. J.; GENOUD, T.; ROULIN, S.; SUMMERMATTER, K. Xyloglucans in different types of cotton (*Gossypium* sp.) cells. **Acta Bot. Nederl.**, v. 42, n. 2, p. 213-219, 1993.

BUCKERIDGE, M. S.; CROMBIE, H. J.; MENDES, C. J. M.; REID, J. S. G.; GIDLEY, M. J.; VIEIRA, C. C. J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydr. Res.**, v. 303, p. 233-237, 1997.

BUCKERIDGE, M. S.; DALVA, C. R.; GRANT REID, J. S.; DIETRICH, S. M. C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**, v. 86, p. 145-151, 1992.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Galactomannans from Brazilian legume seeds. **Rev. Brasil. Bot.**, v. 13, p. 109-112, 1990.

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 12 (Edição Especial), p. 137-162, 2000.

BUSATO, A. P.; REICHER, F.; DOMINGUES, R.; SILVEIRA, J. L. M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 410-414, 2009.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F. Xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 525-531, 2001.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N. C.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, p. 52-108, 2000.

CAVALIER, D. M.; LEROUXEL, O.; NEUMETZLER, L.; YAMAUCHI, K.; REINECKE, A.; FRESHOUR, G.; ZABOTINA, O. A.; HAHN, M. G.; BURGERT, I.; PAULY, M.; RAIKHEL, N. V.; KEEGSTRA, K. Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. **The Plant Cell**, v. 20, 1519-1537, 2008.

CHAMBAT, G.; BARNOUD, F.; JOSELEAU, J.-P. Structure of the primary cell walls of suspension-cultured *Rosa glauca* cells. **Plant Physiology**, v. 74, p. 687-693, 1984.

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 5–24, 2007.

DARVILL, A. G.; AUGUR, C.; BERGMANN, C.; CARLSON, R. W.; CHEONG, J.-J.; EBERHARD, S.; HAHN, M. G.; LÓ, V.-M.; MARFÁ, V.; MEYER, B.; MOHNEN, D.; O'NEILL, M. A.; SPIRO, M. D.; van HALBEEK, H.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defense responses in plants. **Glycobiology**, v. 2, n. 3, p. 181-198, 1992.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 31, p. 241, 1975.

DOCO, T.; WILLIAMS, P.; PAULY, M.; O'NEILL, M. A.; PELLERIN, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 253–261, 2003.

DONADIO, L.C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. K. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: FUNEP, 279 p., 1988.

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

FARKAS, V.; SULOVA, Z.; STRATILOVA, E.; HANNA, R.; MACLACHLAN, G. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 298, n<sup>o</sup>. 2, p. 365-370, 1992.

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.

FINCHER, G. B. Exploring the evolution of (1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucans in plant cell walls: comparative genomics can help! **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 12, p. 1-8, 2009.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; SANTOS, G. L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 507-514, 2005.

FRY, S. C. The structure and the functions of xyloglucan. **J. Exp. Bot.**, v. 40, n. 211, p. 1-11, 1989.

FRY, S. C.; SMITH, R. C.; RENWICK, K. F.; MARTIN, D. J.; HODGE, S. K.; MATTHEWS, K. Xyloglucan endotransglycosylase a new wall-loosening enzyme activity from plants. **Biochem. J.**, v. 282, p. 821-828, 1992.

FRY, S. C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J.-P.; KATO, Y.; LORENCES, E. P.; MacLACHLAN, G. A.; McNEIL, M.; MORT, A.; REID, J. S. G.; SEITZ, H. U.; SELVENDRAN, R. R.; VORAGEN, A. G. J.; WHITE, A. R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiol. Plant., Denmark**, v. 89, p. 1-3, 1993.

GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes. **Nature**, v. 191, p. 1295-1296, 1961.

GIDLEY, M. J.; LILLFORD, P. J.; ROWLANDS, D. W.; LANG, P.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V.; EDWARDS, M.; FANUTTI, C.; REID, J. S. G. Structure and solution properties of tamarind seed polysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 214, p. 299-314, 1991.

GURJÃO, K. C. O.; BRUNO, R. L. A.; ALMEIDA, F. A. C.; PEREIRA, W. E.; BRUNO, G. B. Desenvolvimento de frutos e sementes de tamarindo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 351-354, 2006.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAYASHI, T. Xiloglucans in the primary cell wall. **Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.**, v. 40, p. 139-168, 1989.

JOSELEAU, J.-P.; CHAMBAT, G. Structure of the Primary Cell Walls of Suspension-Cultured *Rosa glauca* Cells. **Plant Physiol.**, v. 74, p. 694-700, 1984.

KAI, K. C.; GABARDO, J.; PETKOWICZ, C. L. O. Obtenção de oligossacarídeos de xiloglucanas de sementes. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (EVINCI) E 1º. EVENTO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA (EINTI), 16, 2008, Curitiba. **Livro de Resumos - 16º. Evento de Iniciação Científica (EVINCI) e 1º. Evento de Inovação**

**Tecnológica (EINTI) - Caminhos da Ciência: As idéias que transformaram o mundo.** Curitiba: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG/ UFPR, v. 1, p. 108, 2008.

KAI, K. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Efeito do tempo de extração sobre as características de xiloglucanas isoladas de cotilédones de *Hymenaea courbaril*. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (15º. EVINCI), 15, 2007, Curitiba. **Livro de Resumos - 15º. Evento de Iniciação Científica (EVINCI).** Curitiba: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG/ UFPR, v. 1, p. 140, 2007.

KAI, K. C. ; PETKOWICZ, C. L. O. Effect of xyloglucan and the mixture of its oligosaccharides on growth of pea plantlets. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 38, 2009, Águas de Lindóia. **XXXVIII Annual Meeting of SBBQ.** Disponível em: <<http://www.sbbq.org.br/2009/resumos/R8384.doc>>. Acesso em 28/06/2009.

KATO, Y.; UCHIDA, J.; SEIKO, T.; MITSUISHI, Y. Structural analysis of the oligosaccharide units of xyloglucan and their effects on growth of COLO 2001 human tumor cells. **International Congress Series**, v. 1223, p. 161-164, 2001.

KAKEGAWA, K.; EDASHIGE, Y.; ISHI, T. Xyloglucan from xylem-differentiating zones of *Cryptomeria japonica*. **Phytochemistry**, London, v. 47, n. 5, p. 767-771, 1998.

KAWASAKI, N.; OHKURA, R.; MIYAZAKI, S.; UNO, Y.; SUGIMOTO, S.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, p. 227-234, 1999.

KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K.W.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 188-197, 1973.

KOMUTARIN, T.; AZADI, S.; BUTTERWORTH, L.; KEIL, D.; CHITSOMBOON, B.; SUTTAJIT, M.; MEADE, B. J. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 649-658, 2004.

KOOIMAN, P. On the occurrence of amyloids in plant seeds. **Acta Bot. Neerl.**, v. 9, p. 208-219, 1960.

KOOIMAN, P. Partial enzymic degradation of Tamarindus-amyloid. **Nature**, v. 179, p. 201, 1957.

KOOIMAN, P. The constitution of Tamarindus amyloid. **Rec. Trav. Chim. Pays-Bas**, v. 80, p. 849-865, 1961.

KOOIMAN, P. The constitution of the amyloid from seeds of *Amona muricata*. **Phytochemistry**, London, v. 6, p. 1665-1673, 1967.

LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 157-163, 2001.

LIMA, D. U.; LOH, W.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan-celullose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 389-394, 2004.

LIMA, D. U.; OLIVEIRA, R. C.; BUCKERIDGE, M. S. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking. **Carbohydr. Polym.**, v. 52, p. 367-373, 2003.

LIMA, N. N.; REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAKOWSKI, M. R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. stilbocarpa (jatobá). **Cien. Cult**, v. 45, n. 1, p. 22-26, 1993.

LIMA-NISHIMURA, N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y. G.; WILHELM, M.; RIBAS, L. L. F.; SIERAKOWSKI, M. R. A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Cell Biol. and Morphogenesis**, v. 21, p. 402-407, 2003.

MAEDA, T.; YAMASHITA, H.; MORITA, N. Application of xyloglucan to improve the gluten membrane on breadmaking. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 658-664, 2007.

MAITI, R.; JANA, D.; DAS, U. K.; GHOSH, D. Antidiabetic effects of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 85-91, 2004.

MARRY, M.; CAVALIER, D. M.; SCHNURR, J. K.; NETLAND, J.; YANG, Z.; PEZESHK, V.; YORK, W. S.; PAULY, M.; WHITE, A. R. Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 347–356, 2003.

MARTINELLO, F.; SOARES, S. M.; FRANCO, J. J.; SANTOS, A. C.; SUGOHARA, A.; GARCIA, S. B.; CURTI, C.; UYEMURA, S. A. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 810-818, 2006.

MARTIN, S.; FREITAS, R.A.; OBAYASHI, E.; SIERAKOWSKI, M.-R. Physico-chemical aspects of galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* and its tetraborate complex. **Carbohydr. Polym.**, v. 54, p. 287-295, 2003.

MASTROMARINO, P.; PETRUZZIELLO, R.; MACCHIA, S.; RIETI, S.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 39, p. 339-345, 1997.

McDOUGALL, G. J.; FRY, S. C. Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulose: evidence for a role of cellulose in cell expansion. **Plant Physiol.**, v. 93, p. 1042-1048, 1990.

McDOUGALL, G. J.; FRY, S. C. Anti-auxin activity of xyloglucan oligosaccharides: the role of groups other than the terminal  $\alpha$ -L-fucose residue. **J. Exp. Bot.**, v. 40, n<sup>o</sup>. 211, p. 233-238, 1989a.

McDOUGALL, G. J.; FRY, S. C. Structure-activity relationships for xyloglucan oligosaccharides with antiauxin activity. **Plant Physiol.**, v. 89, p. 883-887, 1989b.

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELÉNDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, v. 13, p. 272-276, 2006.

MIYAZAKI, S.; SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K. ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 56, p. 75-83, 1998.

MIYAZAKI, S.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; ENDO, K.; TAKAHASHI, A.; ATTWOOD, D. In situ gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 229, p. 29-36, 2001.

OLIVEIRA JUNIOR, C. J.; BRAGA, M. R.; BUCKERIDGE, M. S. Efeitos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o metabolismo extracelular de *Rudgea jasminoides* durante o crescimento. **Hoehnea**, v. 33, p. 239-246, 2006.

O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: The Plant cell wall. **Annual Plant Review**. eds. JKC. Rose CRC Press, v.8, p.1-54, 2003.

ONWELUZO, J. C.; RAMESH, H. P.; THARANATHAN, R. N. Characterization of free sugars and xyloglucan-type polysaccharides of two tropical legumes. **Carbohydr. Polym.**, v. 47, p. 253-257, 2002.

PAULA, F. S.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; FIGUEIREDO, A. S. G.; AZZOLINI, A. E. C. S.; UYEMURA, S. A.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 163-170, 2009.

PAREDES, L. L. R. **Extração e caracterização dos polissacarídeos das raízes de *Lepidium meyenii* e testes de atividade inseticida**. Curitiba, 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PETKOWICZ, C. L. O.; RECHIA, C. G. V.; BUSATO, A. P.; REICHER, F. Xiloglucanas: estrutura, propriedades e aplicações. **Carboidratos em Alimentos Regionales Iberoamericanos**. São Paulo: EdUSP, 2006. p. 125-147.

PICOUT, D. R.; ROSS-MURPHY, S.; ERRINGTON, N.; HARDIN, S. E. Pressure cell assisted solubilization of xyloglucans: tamarind seed polysaccharide and detarium gum. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 799-807, 2003.



PONGSAWATMANIT, R.; TEMSIRIPONG, T.; IKEDA, S.; NISHINARI, K. Influence of tamarind seed xyloglucan on rheological properties and thermal stability of tapioca starch. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 41–50, 2006.

POTTER, I.; FRY, S. C. Changes in xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity during hormone-induced growth in lettuce and cucumber hypocotyls and spinach cell suspension cultures. **J. Exp. Bot.**, v. 45, p. 1703-1710, 1994.

POTTER, I.; FRY, S. C. Xyloglucan endotransglycosylase activity in pea internodes effects of applied gibberellic acid. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 235-241, 1993.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 58-62.

RAY, B.; LOUTELIER-BOURHIS, C.; LANGE, C.; CONDAMINE, E.; DRIOUICH, A.; LEROUGE, P. Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterization of a novel xyloglucan motif. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 201–208, 2004.

REN, Y.; PICOUT, D. R.; ELLIS, P. R.; ROSS-MURPHY, S. B.; REID, J. S. G. A novel xyloglucan from seeds of *Azelia africana* Se. Pers. - extraction, characterization, and conformational properties. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 997-1005, 2005.

RIBEIRO, C.; ARIZAGA, G. G. C.; WYPYCH, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Nanocomposites coated with xyloglucan for drug delivery: *in vitro* studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, p. 204-210, 2009.

ROSÁRIO, M. M. T.; NOLETO, G. R.; BENTO, J. F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v. 69, p. 464-472, 2008.

SAEMAN, J. F., MOORE, W. E., MITCHELL, R. L., MILLET, M. A. Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp. Pap. Ind.**, v. 37, p. 336–343, 1954.

SALAMONI, A. T.; SIERAKOWSKI, M. R.; BOEIRA, J. P.; NETO, O. A. R; QUOIRIN, M. Efeito das xiloglucanas de sementes e derivados no crescimento de *Arabidopsis thaliana*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 314-320, 2008.

SCHATZ, G. E.; FREELAND, C. MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2007, <[http://www.mobot.org/MOBOT/Madagasc/digital/Rakotonandrasana\\_1007\\_RFA\\_s.jpg](http://www.mobot.org/MOBOT/Madagasc/digital/Rakotonandrasana_1007_RFA_s.jpg)> . Acesso em 30/06/2009.

SENGKHAMPARN, N.; VERHOEF, R.; SCHOLS, H. A.; SAJJAANANTAKUL, T.; VORAGEN, A. G. J. Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). **Carbohydrate Research**, 2008, article in press.

SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; NISHINARI, K. Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 25-28, 1998.

SIDDHURAJU, P.; VIJAYAKUMARI, K.; JANARDHANAN, K. Nutritional and antinutritional properties of the underexploited legumes *Cassia laevigata* Willd. and *Tamarindus indica* L.. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 8, p. 351-362, 1995.

SIMS, I.M.; GANE, A. M.; DUNSTAN, D.; ALLAN, G. C.; BOGER, D. V.; MELTON, L. D.; BACIC, A. Rheological properties of xyloglucans from different plant species. **Carbohydr. Polym.**, v. 37, p. 61-69, 1998.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.6, p. 20-24, 1972.

SMITH, R. C.; FRY, S. C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. **Biochem. J.**, v. 279, p. 529-535, 1991.

SONE, Y.; MAKINO, C.; MISAKI, A. Inhibitory effect of oligosaccharides derived from plant xyloglucan on intestinal glucose absorption in rat. **J. Nutr. Vitaminol.**, v. 38, p. 391-395, 1992.

STEVENS, B. J. H.; SELVENDRAN, R. R. Hemicellulosic polymers of cabbage leaves. **Phytochemistry**, London, v. 23, n. 2, p. 339-347, 1984.

STUPP, T.; FREITAS, R. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; DESCHAMPS, F. C.; WISNIEWSKI, A.; BIAVATTI, M. W. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorfii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology**, 2007.

SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; MIYAZAKI, S. SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; SASAKI, M.; ATTWOOD, D. Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mytomycin C. **Int. J. Pharm.**, v. 172, p. 27-32, 1998.

SUN, V.; ANDREW, I. G.; JOBLIN, K. N.; HARRIS, P. J.; MCDONALD, M. HOSKIN, S. O. Polysaccharide compositions of leaf cell walls of forage chicory (*Cichorium intybus* L.). **Plant Science**, v. 170, p. 18–27, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3. ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 339-364.

TAMARINDO. In: PEIXOTO, A. M. (Coord.); SOUZA, J. S. I.; TOLEDO, F. F.; REICHARDT, K.; MOLINA FILHO, J. **Enciclopédia Agrícola Brasileira: S-Z, v. 6**. São Paulo: EdUSP, 2006. 632 p. Disponível em:  
<[http://books.google.com.br/books?id=wqU3SihZqfcC&pg=PA285&lpg=PA285&dq=peixoto+enciclop%C3%A9dia+agr%C3%ADcola+brasileira+tamarindo&source=bl&ots=9naVCPdPm&sig=fExoCDTyOhP4zG\\_emfVLXIXTuNc&hl=pt-BR&ei=afxxSo3ILanEtge4laSNBA&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=2](http://books.google.com.br/books?id=wqU3SihZqfcC&pg=PA285&lpg=PA285&dq=peixoto+enciclop%C3%A9dia+agr%C3%ADcola+brasileira+tamarindo&source=bl&ots=9naVCPdPm&sig=fExoCDTyOhP4zG_emfVLXIXTuNc&hl=pt-BR&ei=afxxSo3ILanEtge4laSNBA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2)>.  
Acesso em 28/06/2009.

TAKAHASHI, A.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; LOEBENBERG, R.; BACHYNSKY, J.; ATTWOOD, D. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, p. 179-186, 2002.

TINÉ, M. A. S.; LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Galactose branching modulates the action of cellulose on seed storage xyloglucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 135–141, 2003.

VARGAS-RECHIA, C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; HEYRAUD, A.; DRIGUEZ, H.; LIÉNART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 1013-1021, 1998.

VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plants cell architecture. **Cell**, v. 56, p. 231-239, 1989.

VINCKEN, J.-P.; YORK, W. S.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 9-13, 1997.

WAGNER, H.; STUPPNER, H.; SCHAFER, W.; ZENK, M. Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. **Phytochemistry**, London, v. 27, p. 119-126, 1988.

WANG, Q.; ELLIS, P. R.; ROSS-MURPHY, S. B.; REID, J. S. G. A new polysaccharide from a traditional Nigerian plant food: *Detarium senelagense* Gmelin. **Carbohydrate Research**, v. 284, p. 229-239, 1996.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.2, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem**, New York, v.2, p. 65-68, 1963a.

YAMANAKA, S.; YUGUCHI, Y.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K. Gelation of tamarind seed polysaccharide xyloglucan in the presence of ethanol. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 125-128, 2000.

YAMATOYA, K.; SHIRAKAWA, M.; KUWANO, K.; SUZUKI, J.; MITAMURA, T.; Effects of hydrolyzed xyloglucan on lipid metabolism in rats. **Food Hydrocol.**, v. 10, p. 369-372, 1996.

YORK, W. S; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by xyloglucan oligosaccharide. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 295-297, 1984.

YORK, W. S.; HARVEY, L. K.; GUILLEN, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Structural analysis of tamarind xyloglucan oligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase digestion and spectroscopic methods. **Carbohydr. Res.**, v. 248, p. 285-301, 1993.

ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MÜLLER, B.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 1129-1138, 1995.