1. INTRODUÇÃO

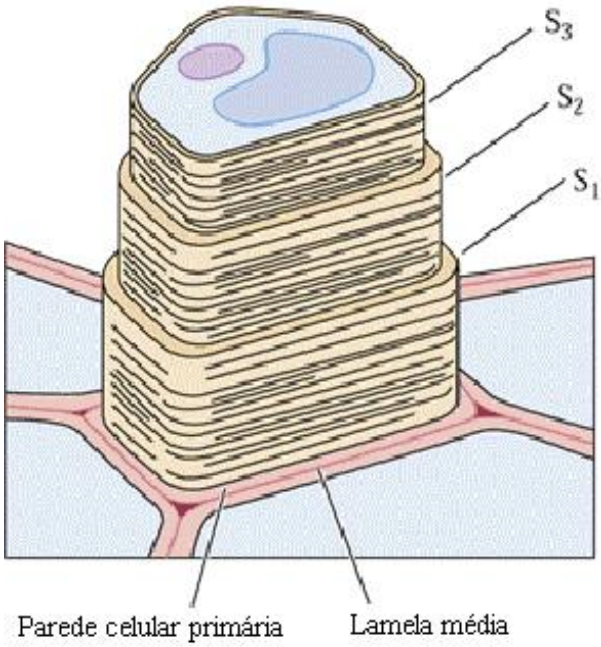
1.1 PAREDE CELULAR

Nos organismos multicelulares, as células são embebidas em uma complexa matriz extracelular que influencia a sua forma e desenvolvimento. Células animais possuem esta matriz extracelular na sua superfície, mas as células vegetais possuem uma parede composta principalmente de polissacarídeos que as envolve completamente. Várias diferenças entre animais e vegetais com respeito à nutrição, crescimento, reprodução e mecanismos de defesa podem ser traçadas a partir do estudo da parede celular vegetal sendo esta uma distinção fundamental entre estes dois tipos de organismos (CARPITA; GILBEAUT, 1993; PERRIN, 1999).

A parede celular está presente em todos os estágios de desenvolvimento da célula vegetal (O'NEILL; YORK, 2003). Esta estrutura desempenha um papel fundamental, pois regula a velocidade e a direção do crescimento da célula e exerce grande influência na morfologia da planta. A parede celular apresenta várias funções tais como: estrutural, contém moléculas sinalizadoras que participam da comunicação célula-célula e parede-núcleo, secretam moléculas de defesa e formam uma armadura contra patógenos. Em circunstâncias específicas pode participar do reconhecimento inicial de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio (CARPITA; Mc CANN, 2000).

A parede celular é uma estrutura dinâmica que se altera no decorrer da vida celular. Dois tipos de parede celular podem ser observados, primária e secundária, os quais são diferenciadas por suas composições químicas e pelo período em que surgem no decorrer do desenvolvimento celular. A parede primária aparece durante a divisão celular e aumenta sua área de superfície durante a expansão da célula. Já a parede secundária é formada internamente à primária na diferenciação, formando uma estrutura complexa adaptada a função da célula. Entre as paredes primárias de células vizinhas encontra-se uma estrutura denominada lamela média (Figura 1) (O'NEILL; YORK, 2003; CARPITA; Mc CANN, 2000).

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



FONTE: CARPITA, N; Mc CANN, M. The cell wall. In:BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologist, Maryland, 2000, p.54.

NOTA: Célula vegetal mostrando as diferentes camadas da parede celular secundária (S_1, S_2 e S_3), a parede celular primária e a lamela média entre as paredes primária de células adjacentes.

O primeiro modelo de parede celular primária foi proposto por Albersheim e sua equipe em 1973. Neste estudo foi demonstrado de forma conjunta a interação dos diferentes componentes conhecidos, como, 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, arabinogalactanas e xiloglucanas, bem como uma glicoproteína. (KEEGSTRA et al., 1973; ALBERSHEIM, 1975). Posteriormente, HAYASHI (1989) e

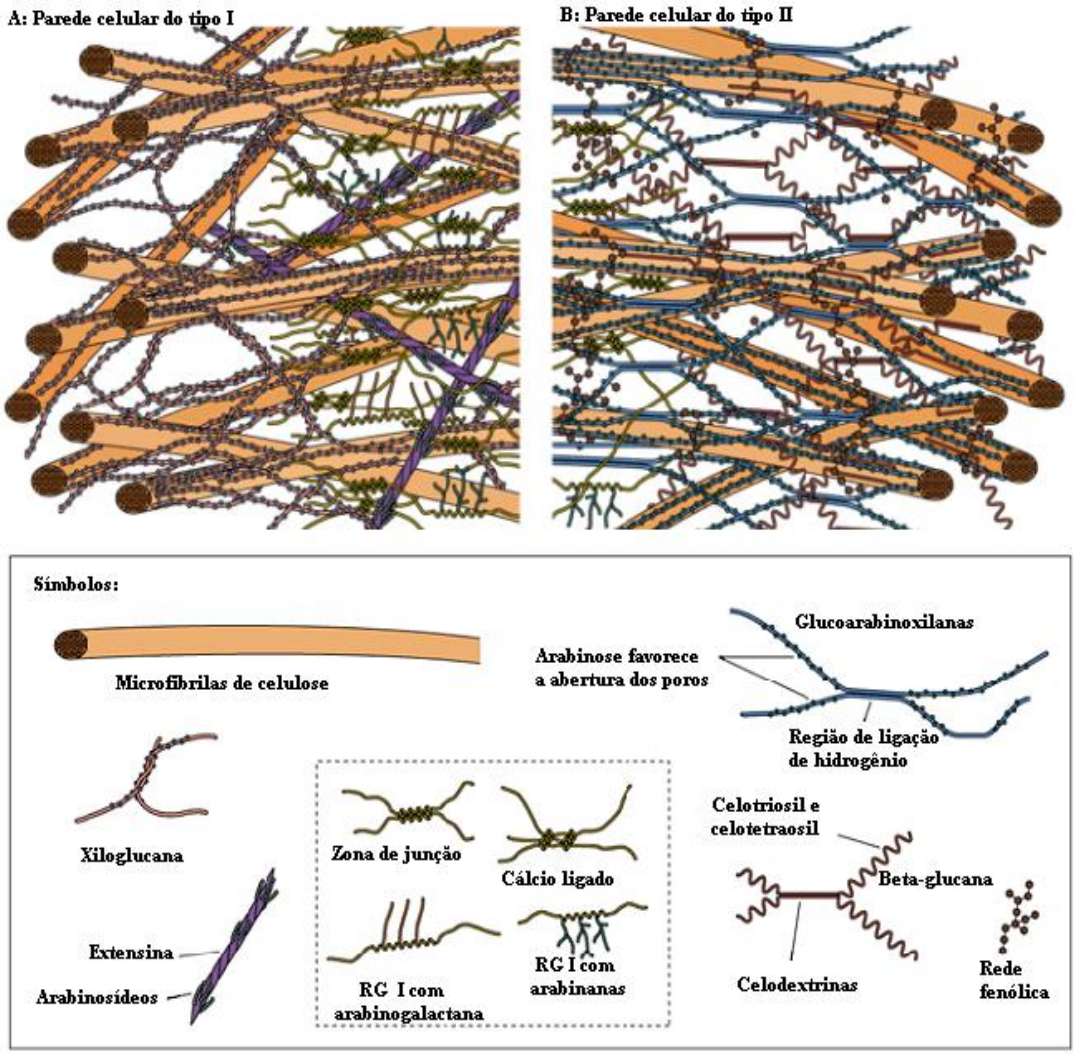
FRY (1989) propuseram que as microfibrilas de celulose seriam interconectadas por pontes de hidrogênio ao longo das cadeias de xiloglucana. Polissacarídeos pécticos e proteínas participariam independentemente, envolvendo o complexo celulose-xiloglucana de maneira não-covalente.

Atualmente um dos modelos mais aceitos de parede celular primária foi elaborado por CARPITA e GIBEAUT (1993) que propuseram dois tipos de estrutura para as angiospermas com base nas diferenças na quantidade de polissacarídeos pécticos e hemicelulose principal. O primeiro modelo, chamado de parede do tipo I, inclui a parede das espécies de dicotiledôneas em geral e algumas monocotiledôneas (não comelinóides). A parede do tipo II corresponde à parede das Poaceaes e engloba a maior parte das monocotiledôneas (comelinóides).

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, a qual pode interagir com os polissacarídeos. (CARPITA; McCANN, 2000).

Na parede celular do tipo II as microfibrilas de celulose estão interligadas as 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). Na Figura 2 os desenhos esquemáticos mostram os dois tipos de parede celular primária.

FIGURA 2 - MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II



FONTE: CARPITA, N; Mc CANN, M. The cell wall. In:BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologist, Maryland, 2000, p.81.

NOTA: A: Modelo tridimensional de parede celular primária do tipo I mostrando as interações moleculares entre celulose, xiloglucanas e pectinas. B: Modelo tridimensional da parede celular do tipo II, mostrando a interação molecular entre celulose, glucuronoarabinoxilanas, pectinas e substâncias aromáticas.

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

1.2 XILOGLUCANAS

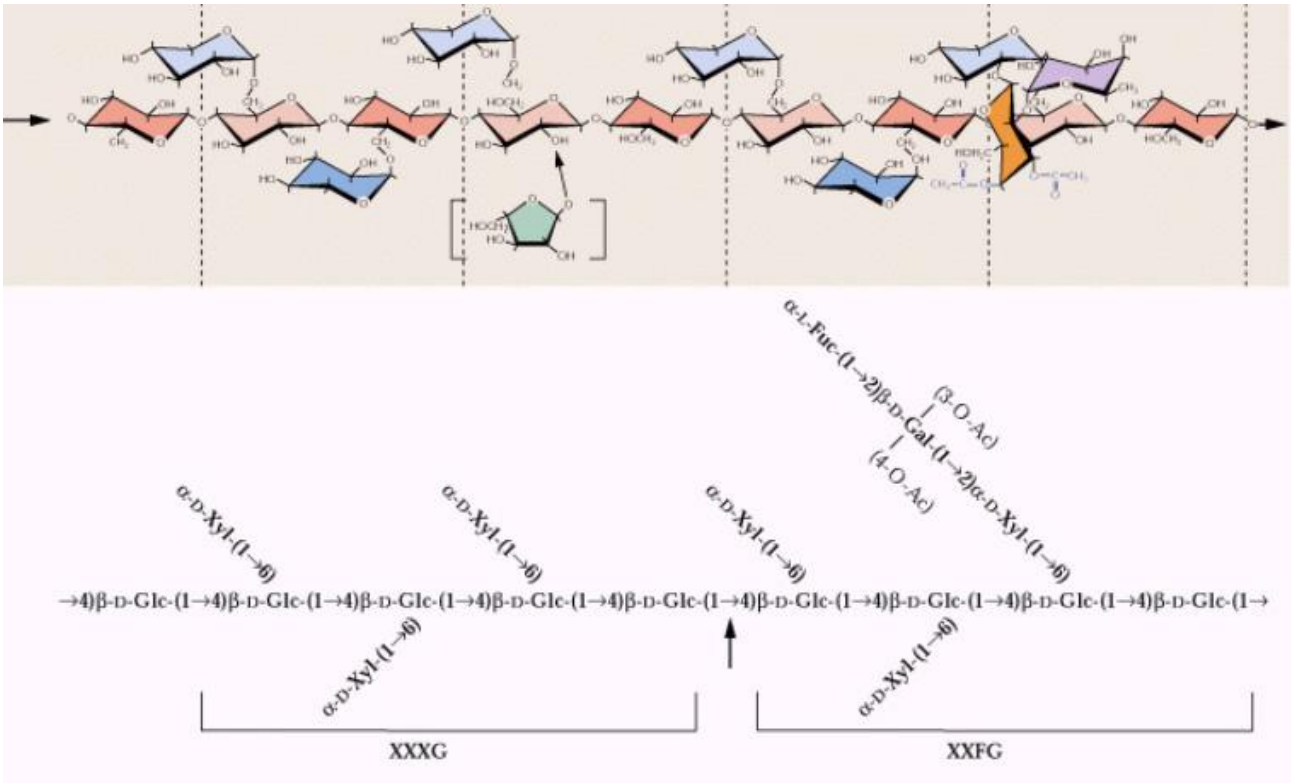
As xiloglucanas são polissacarídeos que apresentam funções distintas no vegetal. Possuem um importante papel estrutural por estarem presentes na parede celular primária de vegetais superiores, além de atuarem como material de reserva em sementes de certas espécies de dicotiledôneas. As xiloglucanas também podem apresentar função regulatória, pois seus oligossacarídeos, os quais são denominados oligossacarinas, regulam o crescimento celular (KOOIMAN, 1960; McNEIL et al., 1984; HAYASHI, 1989).

As xiloglucanas são sintetizadas no complexo de Golgi e então transportadas para a parede celular. Este transporte ocorre por meio de uma vesícula secretória a qual se funde a membrana plasmática excretando o polissacarídeo para a parede celular (WHITE; XIN; PEZESHK, 1993; FOSKET, 1994).

As xiloglucanas apresentam uma cadeia principal constituída por unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. A cadeia principal pode ser substituída em O-6 por unidades de α-D-xilopiranose, a qual também pode ser substituída em O-2 por unidades de β-D-galactopiranose (FRY, 1989; HAYASHI, 1989; CARPITA; McCANN, 2000).

A estrutura básica da xiloglucana de reserva e a estrutural são semelhantes, apresentando D-glucose, D-xilose e D-galactose em proporção de aproximadamente 4:3:1 (FRY, 1989; McNEIL et al., 1984; HAYASHI, 1989). Entretanto, nas xiloglucanas de parede celular primária as unidades de β-D-galactopiranose podem ser substituídas em O-2 por unidades de α-L-fucose, sendo assim denominadas xiloglucanas fucosiladas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Na Figura 3 pode-se observar a representação de um segmento de uma cadeia de uma xiloglucana de parede primária. Segundo FRY (1989) as cadeias laterais possuem alguma regularidade de distribuição ao longo da cadeia celulósica.

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM SEGMENTO DE CADEIA DE XILOGLUCANA DE PAREDE CELULAR DO TIPO I



FONTE: CARPITA, N; Mc CANN, M. The cell wall. In:BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologist, Maryland, 2000, p.66.

A estrutura das xiloglucanas de parede celular primária tem sido extensivamente revisada (McNEIL; DARVILL; FRY, 1984; HAYASHI, 1989; FRY, 1989) desde que este polissacarídeo foi inicialmente isolado de cultura de células em suspensão de *Acer*

pseudoplatanus (BAUER *et al.*, 1973). 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; LORENCES, 2004).

Xiloglucanas fucosiladas têm sido isoladas da parede celular das folhas de diferentes espécies, como *Brassica oleracea* (repolho) (STEVENS; SELVENDRAN, 1984), *Gossypium* sp. (algodão), (BUCHALA et al., 1993), *Arabidopsis thaliana*, (ZABLACKIS et al., 1995), *Digitalis purpurea* (HENSEL; SCHMIDGALL; KREIS, 1998), *Hymenaea courbaril* (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001) e *Cichoruim intybus* (chicória) (SUN et al., 2006)

Ao analisar a estrutura da xiloglucana presente na folha de *Hymenaea courbaril* BUSATO et al. (2005) observaram que além da substituição em O-2 nas unidades de xilose, esta unidade também pode estar substituída em O-4.

Alguns trabalhos descrevem a ocorrência de xiloglucanas fucosiladas em frutos. A xiloglucana obtida de parede celular do *Diospyros kaki* L. (caqui) foi caracterizada, sendo a proporção de Glc: Xyl: Gal: Fuc de 10: 6: 3,4: 1,4 (CUTILLAS – ITURRALDE et al., 1996). REDGWELL, MELTON e BRASCH (1988) obtiveram 15-25% de xiloglucana a partir de quatro diferentes tecidos do *Actinidia deliciosa* (kiwi), sendo que cada tecido contêm tipos similares de polissacarídeo. RENARD et al. (1995) e DOCO et al. (2003) utilizaram material despectinizado para isolar xiloglucanas estruturais de maçã e uva.

VIERHUIS et al. (2000) obtiveram frações hemicelulósicas ricas em xilana e xiloglucana a partir de frutos da oliveira em diferentes estágios de maturação. Os autores não observaram alterações na composição e distribuição de massa molar das frações contendo xiloglucanas. Entretanto, o processo de amadurecimento de frutos que está associado a alterações na parede celular parece envolver modificações nas xiloglucanas. Estudos utilizando frutos de *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Cucumis melo* (melão) e *Ficus carica* (figo) têm demonstrado que as xiloglucanas sofrem degradação durante a

maturação, resultando em alterações na quantidade e massa molar destes polissacarídeos (SAKURAI; NEVINS, 1993; ROSE et al., 1998; OWINO et al., 2004).

FRY et al. (1993) sugeriram uma nomenclatura para os oligossacarídeos obtidos a partir de xiloglucanas, nas quais as cadeias laterais são nomeadas através das unidades monossacarídicas que não são substituídas, da esquerda para direita. 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. Já com galactose, arabinose e fucose, como unidades terminais, 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 estão indicadas algumas cadeias laterais encontradas, nas xiloglucanas e a letra que representa a respectiva estrutura. (SIMS et al., 1996; VINCKEN et al., 1996; HANTUS et al., 1997; YORK et al., 1996; FRY et al., 1993; RAY et al., 2004). Na Figura 5 estão representados os principais oligossacarídeos de parede celular primária do tipo I.

Baseado no número de unidades de glucose substituídas, VINCKEN et al. (1997) dividiram as xiloglucanas em dois grupos. O primeiro chamado de poli-XXXG apresenta a cadeia principal contendo três unidades consecutivas de glucose substituídas em O-6 por unidades de xilose e uma quarta unidade de glucose não ramificada. Este grupo inclui as xiloglucanas encontradas em muitas gimnospermas e nas angiospermas (O'NEILL; YORK, 2003), como observado nos oligossacarídeos obtidos de xilema de *Cryptomeria japonica* (KAKEGAWA; EDASIGE; ISHIL, 1998) e em *Vitis vinifera* (uva) (DOCO et al., 2003), respectivamente.

O outro grupo é encontrado nas espécies Solanaceas sendo definido como poli-XXGG, o qual possui duas unidades de glucose substituídas com unidades de xilose, alternadas a duas unidades de glucose não substituídas. Este tipo de estrutura foi observado em xiloglucana de *Lycopersicon esculentum* (tomate) (JIA et al., 2003), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (SIMS et al., 1996; YORK et al., 1996) e *Solanum tuberosum* (batata) (VINCKEN et al., 1996).

FIGURA 4 - CÓDIGO DE UMA LETRA PARA AS CADEIAS LATERAIS DAS XILOGLUCANAS COM DIFERENTES SUBSTITUIÇÕES

α-L-Fuc*p* 1 ↓ 2 β-D-Gal*p* 1 ↓ 2 α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* **F**	β-D-Gal*p* 1 ↓ 2 α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* **L**	α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* **X**	α-L-Gal*p* 1 ↓ 2 β-D-Gal*p* 1 ↓ 2 α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* **J**	α-L-Ara*f* 1 ↓ 2 α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* **S**	α-L-Ara*f* 1 ↓ 2 α-L-Ara*f* 1 ↓ 2 α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* **T**	α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* 2 ↑ 1 α-L-Ara*f* **A**	α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* 2 ↑ 1 β-D-Xyl *p* **B**	α-D-Xyl *p* 1 ↓ 6 β-D- Glc*p* 2 ↑ 1 β-D-Xyl *p* 3 ↑ 1 α-L-Ara*f* **C**	β-D- Glcol **Gol**	α-D-Xyl *p* 1 ↓ 2 β-D-Xyl *p* **U**

FONTE: Adaptado de 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.

Recentemente, HOFFMAN et al. (2005) analisaram xiloglucanas da parede celular de plantas da subclasse Asteridae. Estes autores verificaram que *Ipomoea purpurea*, *Ocimum basilicum* e *Plantago major* apresentam xiloglucanas com um padrão de substituição do tipo XXGGG, contendo cinco unidades de glucose, onde apenas as duas primeiras são substituídas por xilose.

1.2.1 Xiloglucanas de reserva

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. A diferença entre os polissacarídeos estruturais e de reserva é muito tênue não sendo bem definida, isto é, muitos carboidratos presentes nas sementes possuem estrutura muito semelhante as dos encontrados na parede celular, sendo estes isolados de outros tecidos. Além do amido, há

FIGURA 5 - ESTRUTURA SIMPLIFICADA E NOMENCLATURA PARA PRINCIPAIS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DE TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE XILOGLUCANAS

ESTRUTURA	NOMENCLATURA
Glc→Glc→Glc ↑ ↑ Xyl Xyl	XXG
Glc→Glc→Glc→Glc ↑ ↑ ↑ Xyl Xyl Xyl	XXXG
Glc→Glc→Glc→Glc ↑ ↑ ↑ Xyl Xyl Xyl ⇑ Gal	XXLG
Glc→Glc→Glc→Glc ↑ ↑ ↑ Xyl Xyl Xyl ⇑ Gal	XLXG
Glc→Glc→Glc→Glc ↑ ↑ ↑ Xyl Xyl Xyl ⇑ ⇑ Gal Gal	XLLG
Glc→Glc→Glc→Glc ↑ ↑ ↑ Xyl Xyl Xyl ⇑ Gal ⇑ Fuc	XXFG
Glc→Glc→Glc→Glc ↑ ↑ ↑ Xyl Xyl Xyl ⇑ ⇑ Gal Gal ⇑ Fuc	XLFG

Nas estruturas, as setas indicam as ligações glicosídicas: →, ligação β-(1→4);↑, ligação α-(1→6); ⇑, ligação (1→2)

FONTE: 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.

diversos tipos de polissacarídeos de reserva entre eles: mananas, galactomananas, galactoglucomananas, glucanas e xiloglucanas (AVIGAD; DEY, 1997).

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).

Os trabalhos de KOOIMAN (1957, 1967) foram dos primeiros que descreveram as xiloglucanas. Nestes trabalhos este polissacarídeo foi extraído 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; LANG et al., 1990, 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 a xiloglucana de tamarindo (LIMA et al., 1993; 1995). BUCKERIDGE et al. (1997) com a utilização de α- xilosidase e β-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 desta mesma espécie após tratamento com endo-1,4-β-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).

Estudos visando avaliar os efeitos do nível de oxidação sobre a estrutura, conformação e propriedades térmicas da xiloglucana de jatobá mostraram que o aumento da oxidação nas unidades de galactose, resulta em uma diminuição da sua massa molar. A presença de ácido galacturônico na estrutura, devido à oxidação das unidades de galactose, gera uma molécula mais rígida, partindo de uma conformação ao acaso para uma estrutura em bastão. Os autores observaram também que a cinética de degradação térmica depende diretamente do aumento do grau de oxidação (FREITAS et al., 2003).

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-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.

LIMA, OLIVEIRA e BUCKERIDGE (2003) analisaram os efeitos de xiloglucanas de sementes de diferentes espécies (*Hymenaea courbaril, Copaifera langsdorffii, 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.

TEIXEIRA (2005) isolou e caracterizou por metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, uma xiloglucana das sementes de *Mucuna sloanei*. Outra espécie de Mucuna, *Mucuna flagellipes*, foi utilizada por ONWELUZO; RAMESH e THARANATHAN (2002) para obtenção de xiloglucanas. A farinha das sementes de *Mucuna sloanei, Mucuna flagellipes* e *Detanium senegalense* é utilizada na Nigéria e certos países da África como espessante em alimentos (ALIWE et al., 1997; WANG et al., 1996; ONWELUZO; RAMESH; THARANATHAN, 2002).

Em geral, as xiloglucanas produzem soluções aquosas altamente viscosas, despertando interesse industrial, tanto na indústria alimentícia como na farmacêutica. A xiloglucana do tamarindo é utilizada comercialmente devido as suas propriedades espessantes. O polissacarídeo parcialmente degradado por β-galactosidase exibe propriedades geleificantes e a temperatura transição de sol-gel varia de acordo com o grau de eliminação de galactose. Vários estudos têm mostrado que o gel obtido pode ser utilizado para a liberação controlada de fármacos, podendo ser administrado por via retal (MIYAZAKI et al., 1998), intraperitoneal (SUISHA et al., 1998), oral (KAWASAKI et al., 1999), ocular (MIYAZAKI et al., 2001) e pericutânea (TAKASHI et al., 2002).

A análise da xiloglucana da semente de *Detarium senegalense* mostrou que esta apresenta massa molar e viscosidade intrínseca superior a xiloglucana de tamarindo (WANG et al., 1996).

Recentemente, REN et al. (2005) isolaram uma xiloglucana das sementes de *Afzelia africana*, a qual apresentou viscosidade intrínseca inferior a xiloglucana de *Detarium senegalense* sugerindo uma menor massa molar.

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).

Além das propriedades reológicas, aspectos biológicos atraem a atenção para as xiloglucanas. 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).

Estudos realizados por HENSEL e MEIER (1999) sugerem que as xiloglucanas podem ser adicionadas em alimentos com a função de agentes antimutagênicos. A xiloglucana das sementes de *Tropaeolum majus* apresentou atividade antimutagênica, com inibição dose-dependente variando de 20-50% contra o agente mutagênico 1-nitropireno.

Xiloglucanas de tamarindo modificadas, apresentando diferentes graus de sulfatação exibiram atividade antiviral contra o vírus da rubéola (MASTROMARINO et al., 1997).

A xiloglucana isolada de sementes de *Tamarindus indica*, promoveu o aumento da capacidade fagocítica em monócito humanos e ativou o "burst" respiratório (PAULY; FREIS; PAULY, 1999).

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.

Considerando as evidências existentes na literatura sobre a atividade biológica de xiloglucanas, neste trabalho pretende-se isolar xiloglucanas e testar os seus efeitos sobre macrófagos peritoneais de camundongo.

1.3 MACRÓFAGOS

Macrófagos são células do grupo dos fagócitos mononucleares, os quais originam-se na medula óssea e após sua maturação penetram no sangue periférico incompletamente diferenciados sendo então denominados monócitos. Os monócitos migram para os tecidos

e para o foco inflamatório onde se diferenciam em macrófagos (ADAMS, 1979; ABBAS, 2000).

Os macrófagos estão amplamente distribuídos pelo corpo, mais especificamente no baço, fígado (células de Kupffer), pulmão (macrófagos alveolares), sistema nervoso central (micrógliais), ossos (osteoclastos) e na pele (células de Langehans), onde apresentam características morfológicas e funcionais específicas para cada tecido. Nestes locais, os macrófagos são responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios e constituem uma defesa imediata contra elementos estranhos ao organismo (ABBAS, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Estas células fagocíticas são importantes tanto na defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos, como também em uma variedade de respostas imunológicas e inflamatórias incluindo, processamento e apresentação de antígenos, regulação da resposta dos linfócitos, reparo tecidual, além de atividade citotóxica, como por exemplo contra células tumorais (WING; REMINGTON, 1980).

Os macrófagos podem ser divididos em três grupos funcionais: 1) macrófagos residentes, que são derivados da cavidade peritoneal sem estímulo prévio; 2) macrófagos elicitados, que são recrutados para a cavidade peritoneal por um agente inflamatório não-específico, como o tioglicoato de sódio; 3) macrófagos ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção como por *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), o qual produz um exsudato rico em citocinas. Em cada um destes estágios ocorre a expressão de proteínas específica de membrana e de produtos de secreção (COHN, 1978; CRAWFORD et al., 1987; MACKAY; RUSSELL, 1986).

O processo de fagocitose realizado pelos fagócitos mononucleares é mediado por receptores específicos expressos na superfície destas células. No caso do macrófagos, a interação de ligantes com receptores específicos permite que estas células englobem grandes partículas como bactérias, leveduras e células mortas. Um dos receptores relacionados à fagocitose é o receptor para D-manose, o qual reconhece especificamente unidades de carboidratos, às quais se ligam, permitindo assim a internalização de

polímeros terminados em manose, L-fucose e N-acetilglucosamina (STAHL; SCHLESINGER, 1980; SHEPHERD et al., 1981). O receptor para manose não é expresso em monócitos circulantes e a sua expressão em macrófagos é regulada, sendo que glicocorticóides aumentam sua expressão, enquanto que o interferon gama (IFN-γ) diminui (STAHL et al., 1984). Além do receptor para D-manose, macrófagos peritoneais possuem receptores para β-glucanas e assim podem fagocitar diversos polissacarídeos (GOLDAM, 1988).

Em resposta ao processo de fagocitose os macrófagos apresentam antígenos específicos na sua superfície os quais são reconhecidos pelos linfócitos T, que produzem linfocinas ativando os linfócitos B a produzirem e liberarem anticorpos específicos aos antígenos apresentados pelos macrófagos. Além de apresentarem antígenos, os macrófagos ativados produzem, secretam e respondem a diversos mediadores inflamatórios, citocinas, além de proteases e fatores de crescimento importantes no reparo de tecidos (ABBAS et al., 2000).

As principais citocinas produzidas pelos macrófagos são: fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1 β (IL-1β), interleucina-1 α (IL-1α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12) e interleucina 15 (IL-15) na presença de endotoxinas bacteriana, como por exemplo o lipopolissacarídeo (LPS), presente nas paredes celulares de bactéria Gram-negativas. A IL-1β e IL-6 são citocinas pró-inflamatórias, produzidas em respostas a diferentes estímulos, infecções e danos teciduais, já a IL-10 e a IL-12 são citocinas imunoreguladoras que possuem uma grande variedade de efeitos sobre diferentes tipos celulares (ABBAS, 2000). Por outro lado, alguns fatores e sinais são capazes de inibir a produção de citocinas por macrófagos, como as proteínas de choque térmico (FOUQUERAY et al., 1992) e os glicocorticóides (LEW; OPPENHEIN; MATSUSHIMA, 1988; WAAGE; BAKKE, 1988) produzidos durante condições de estresse (CAVAILLON, 1994). Sabe-se também que os macrófagos podem sofrer a ação de citocinas produzidas por outras células, como por exemplo o interferon gama (IFN-γ) que é produzido por linfócitos Th1 e por células “natural killer” (NK) ativadas,

interleucinas 4 (IL-4) e 12 (IL-12), fator-beta transformador do crescimento (TGF-beta) e o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) (ABBAS et al., 2000).

Os macrófagos ativados, podem ainda desencadear o "burst" respiratório e a produção de óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), que são respostas bioquímicas de duas vias oxidativas diferentes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), as quais serão abordadas no decorrer do presente trabalho.

1.4 "BURST" RESPIRATÓRIO

Células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos são capazes de matar microorganismos invasores por um mecanismo dependente de oxigênio, processo denominado "burst" respiratório. A ligação de diversos compostos aos receptores da superfície de fagócitos podem ativar o "burst" respiratório, o qual caracteriza-se por um acentuado aumento no consumo de oxigênio. Este aumento é resultante da ativação de um complexo enzimático NADPH oxidase que catalisa redução do oxigênio a ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) tendo como doador de elétrons o NADPH. Em seguida o $O_2^{\bullet -}$ é convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Estas reações podem ser observadas abaixo (BABIOR, 1992; KLEBANOFF, 1992; ROTROSEN, 1992).

$$NADPH + 2\,O_2 \xrightarrow{\text{NADPH oxidase}} NADP^+ + H^+ + 2\,O_2^{\bullet -}$$

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

O complexo enzimático NADPH-oxidase é constituído por um grande número de subunidades proteicas, que podem ser encontradas tanto no citosol como na membrana plasmática. Em macrófagos não ativados, a NADPH-oxidase está inativa, sendo rapidamente ativada quando estas células são estimuladas por agentes apropriados, que

podem ser cadeias peptídicas de microorganismos como o *N*-formilmetionilleucilfenilalanina (fMLP[2]) ou ésteres de forbol (PMA). Quando a célula está ativada, todos esses componentes são transferidos para a membrana plasmática, onde se ligam ao citocromo b558, o qual é composto por duas subunidades além de uma flavoproteína contendo FAD, para assim formar a NADPH oxidase ativa. (SEGAL; ABO, 1993; BABIOR, 1992).

Os produtos do "burst" respiratório, $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2, destroem os patógenos fagocitados ou presentes no meio extracelular (YAMAGUCHI; KANEDA, 1988; JOHANSSON et al., 1995; PARK et al.; 1992; PARK; BABIOR, 1992; BABIOR, 1992).

A intensidade do "burst" respiratório em macrófagos depende de onde e como eles são obtidos: 1) Macrófagos residentes, os quais não entraram em contato com nenhum estímulo, são pouco ativos; 2) Macrófagos obtidos de animais que entraram em contato como, por exemplo, com o Bacillus Calmette-Guérin (BCG), ou com substâncias como o tioglicolato possuem grande capacidade oxidativa. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Estas células obtidas de animais tratados com o tioglicolato ou éster de forbol (PMA), como estímulo não-particulado, consomem três vezes mais oxigênio durante o processo de fagocitose, quando comparados a células obtidas de animais não tratados (COHEN et al., 1981; JUN; MET; YUAN, 1993). Os ésteres de forbol PMA, *in vitro*, alojam-se na membrana dos macrófagos e ativam a proteína quinase C (PKC), a qual pode ativar a NADPH oxidase através de uma cascata de fosforilação e desfosforilação. (RYVES et al., 1991).

Outros agentes também são capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, como o interferon gama (IFN-γ), o lipopolissacarídeo (LPS) e o muramil dipeptídio da parede bacteriana, estes agentes podem potencializar a resposta destas células ao estímulo do qual originou o "burst" respiratório (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

1.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) é um radical livre permeável à membranas que pode ser produzido por diferentes tipos de células como: células endoteliais vasculares, neurônios, plaquetas, neutrófilos, células do trato respiratório, fibroblastos e hepatócitos. Como um radical livre, ele é capaz de reagir rapidamente com vários compostos, principalmente espécies contendo elétrons desemparelhados, como o oxigênio molecular e metais (MAYER; HEMMENS, 1997; STUEHR; MARLETA, 1987; BILLIAR et al., 1992; NUSSLER; BILLIAR, 1993.).

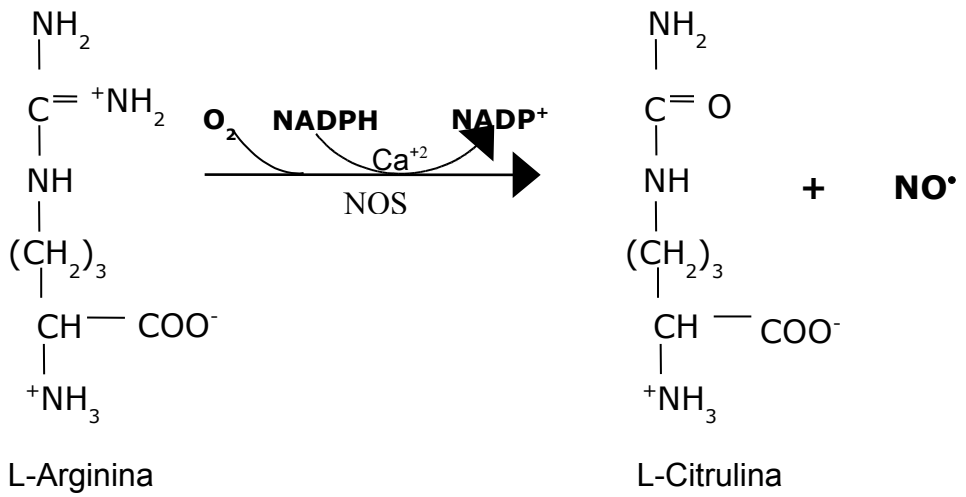
O óxido nítrico atua como uma molécula efetora citostática e citotóxica, inibe o crescimento de diversos agentes de doenças infecciosas como, por exemplo, bactérias, fungos, protozoários e parasitas helmínticos, sendo que, quando produzido por macrófagos desenvolve um papel importante em processos patológicos, como a defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (WOODS et al., 1994; MAcMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

A síntese de óxido nítrico ocorre a partir do átomo de nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-arginina, em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e é dependente de oxigênio molecular. Esta enzima possui uma região C-terminal redutase com distintos sítios de ligação para FAD, FMN e NADPH e um domínio N-terminal oxidase, o qual contem grupo heme ligado e um sítio para o cofator tetrahidrobiopterina (Figura 6) (MAYER; HEMMENS, 1997).

A enzima NOS constitui uma família com três isoenzimas as quais representam produtos de genes distintos, porém muito semelhantes em relação aos seus domínios catalíticos. Em geral, estas isoenzimas são agrupadas em duas categorias, as constitutivas e a induzível. As constitutivas são observadas nas células endoteliais (eNOS) e nos neurônios (nNOS), as quais dependem de cálcio para serem ativadas e produzirem pequenas quantidades de $NO^{\bullet}$ por curtos períodos de tempo. A NO sintase presente nos macrófagos é denominada óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A iNOS possui uma

molécula de calmodulina fortemente ligada, mantendo-a numa conformação ativa, sendo que sua regulação é dependente de cálcio, mesmo presente em baixos níveis (BREDT; SNYDER, 1990; MARLETTA, 1994; MAYER; HEMMENS, 1997).

FIGURA 6 - REAÇÃO DE SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO



A regulação transcricional do gene para a enzima iNOS se faz em resposta a diferentes estímulos, como a IL-1, o IFN-γ, o TNF-α e outros agentes como bactérias (por exemplo, BCG) ou produtos bacterianos (por exemplo, LPS) os quais aumentam a sua expressão, sendo que as interleucinas -4, -8 e –10 (IL-4, IL-8 e IL-10), fator de necrose tumoral β (TNF-β), entre outros, são responsáveis por sua inibição (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1994; JAMES, 1995; MAYER; HEMMENS, 1997). Evidências mostraram a necessidade de moléculas sinais para a indução da atividade efetora desta via bioquímica, seja por LPS + IFN-γ (GREEN et al., 1990) ou por IFN-γ + TNF-α (LIEW et al., 1990). Todas as formas de NOS podem ser inibidas por análogos de arginina N-substituídos, como a N^G-monometil-L-arginina (NMMA), a aminoguanidina ou a N-nitroarginina metil éster (JAMES, 1995).

O óxido nítrico exerce seus efeitos no organismo em células próximas do seu local de síntese e liberação, isto é, por via parácrina. Os efeitos descritos para o óxido nítrico incluem proteção contra danos sistêmicos induzidos por citocinas, inibição da adesão e migração de leucócitos através do endotélio vascular, relaxamento da musculatura lisa vascular, redução da adesão e agregação plaquetária e contribui para o efeito citotóxico exercido por macrófagos para certos microorganismos e células tumorais (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; MONCADA et al., 1994; SCHMIDT; WALTER, 1994; MAYER; HEMMENS, 1997). Entretanto, uma produção descontrolada de óxido nítrico pode levar a uma resposta tóxica, a qual pode resultar em uma série de doenças inflamatórias (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; SCHMIDT; WALTER, 1994; ZHUANG; WOGAN, 1997).

1.6 EFEITOS DE POLISSACARÍDEOS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Alguns polissacarídeos de diversas origens são descritos como capazes de aumentar a resposta imunológica, sendo então denominados como imunomoduladores. Farmacologicamente, essas moléculas tem sido classificadas como modificadores da resposta biológica (BRM) por apresentarem atividade anti-viral, anti-coagulante e anti-tumoral (BOHN; BeMILLER, 1995).

Os polissacarídeos podem ativar macrófagos e desencadear nestas células diferentes respostas como aumento na produção de ânion superóxido ($O^{\bullet}_{2}^{-}$), aumento da produção de $NO^{\bullet}$, promover atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal e aumento da capacidade fagocítica (BERTON; GORDON, 1983; ADACHI et al., 1993; RAMAMOORTHY et al, 1996; DEUK et al., 1998; MORETÃO et al., 2003; 2004; MELLINGER et al., 2005)

Estudos têm sido realizados com β (1→3)-glucanas tanto na forma particulada como solúveis. Estes polímeros possuem uma cadeia principal de unidades de D-glucose β (1→3) com ramificações variadas de unidades D-glucose ligadas β (1→6) (BOHN;

BeMILLER, 1995; KRAUZ; FRANZ, 1991) e têm sido isolados de parede celular de microorganismos, plantas e diversos fungos. Diferentes efeitos foram encontrados, tais como: atividade antitumoral, ativação do sistema de coagulação e ativação de macrófagos que varia de acordo com o polímero utilizado (BOHN; BeMILLER, 1995; SAITÔ et al., 1991, ADACHI et al., 1993; OHYA et al., 1994). Foi observado que macrófagos peritoneais de camundongos possuem receptores para β-glucana, podendo assim reconhecer e fagocitar este polissacarídeo, levando a ativação destas células, caracterizada pela produção e secreção de IL-1, IL-6, TNFα, $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$ bem como aumentar a capacidade fagocítica (ABEL; CZOP, 1992; ADACHI et al., 1993; GOLDMAN, 1988; OKAZAKI et al., 1996; SAKURAI et al., 1992).

A α-glucana, isolada do líquen *Ramalina celastri*, cuja estrutura principal é constituída por ligações (1→3), (1→4) alternadas na proporção 3:1 apresentou efeitos citotóxicos e alterações morfológicas em células HeLa (CARNEIRO-LEÃO, et al., 1997). Quando injetado intraperitonealmente, este polissacarídeo foi capaz de ativar macrófagos, promovendo o aumento da produção de peróxido de hidrogênio e da capacidade fagocítica em macrófagos peritoneais de camundongos (STUELP-CAMPELO et al., 2002).

Estudos com outros polissacarídeos de origem vegetal têm mostrado que estes polímeros são capazes de atuar como modificadores da resposta biológica (BRM). Isto foi observado com uma β (1→4)-manana acetilada (acemanana) extraída da *Aloe vera* onde mostrou-se capaz de ativar macrófagos pelo aumento na produção de $NO^{\bullet}$ (RAMAMOORTHY et al, 1996) . Com uma manana acetilada (acemanana) isolada de outra espécie, *Aloe saponaria*, foi observado a inibição da ativação e proliferação de células tumorais (SAMPEDRO et al., 2003).

A manana extraída de *Saccharomyces cerevisae*, e a galactomanana isolada do líquen *Ramalina celastri*, assim como seus complexos com íon vanadilo mostraram efeitos sobre macrófagos peritoneais de camundongos. Estes polímeros não ativaram a produção de ânion superóxido em macrófagos *in vitro*, porém diminuíram produção de

ânion superóxido estimulada por PMA, sendo que o complexo com o íon vanadilo foi capaz de produzir este efeito em concentração aproximadamente cem vezes menor que a forma não complexada. Também foi observado que a manana e a galactomanana aumentaram a produção de óxido nítrico em 55% e 40%, respectivamente, quando comparada com o grupo controle (NOLETO et al., 2002; 2004). Outro aspecto relevante refere-se ao efeito leishmanicida *in vitro* exercido contra a forma amastigota *Leishmania amazonensis* pela galactomanana e seu complexo com o íon vanadilo. Porém, somente a galactomanana complexada promoveu inibição do crescimento da forma promastigota *Leishmania amazonensis* (NOLETO et al., 2002).

Arabinogalactanas isoladas de diferentes fontes também mostraram ser capazes de ativar macrófagos de diversas formas. MORETÃO et al. (2003; 2004) mostraram que este polissacarídeo (ARAGAL) isolado da goma da *Anadenanthera colubrina* (Angico branco), uma árvore leguminosa nativa do Brasil, ativou macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo*, caracterizado pelo aumento da capacidade fagocítica, atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal, produção de TNF-α, produção de $O_2^{\bullet -}$ e por apresentar atividade anti-tumoral contra células do Sarcoma 180.

Outra arabinogalactana isolada da planta *Phyllanthus niruri* induziu o "burst" respiratório, acarretando em uma alta produção de ânion superóxido. Por outro lado, este polissacarídeo não ativou a via de produção de $NO^{\bullet}$ (MELLINGER et al., 2005).

Considerando os efeitos de diferentes polissacarídeos sobre macrófagos peritoneais de camundongos, neste trabalho as xiloglucanas das sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e *Mucuna sloanei* (mucuna) serão avaliadas quanto a sua atividade sobre estas células do sistema imunológico.

1.7 ESPÉCIES UTILIZADAS NESTE TRABALHO

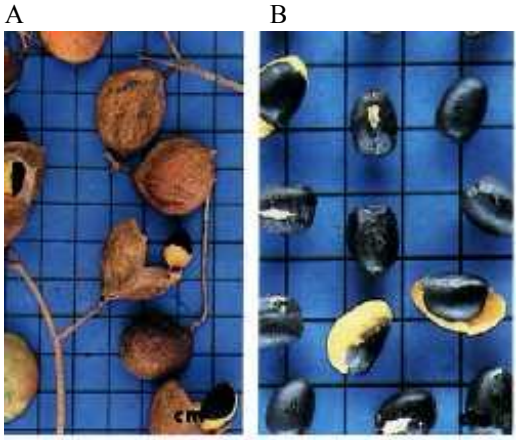
1.7.1 *Copaifera langsdorffii*

De acordo com CRONQUIST (1988), a espécie *Copaifera langsdorffii* pertence a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Caesalpiniaceae e gênero Copaifera.

Esta espécie é conhecida popularmente como: copaíba, copaíba-vermelha, oleiro, copaíba-da-varzea, copaúba, cupiúva, óleo-vermelho, pau-de-óleo e podoi. É um espécie encontrada em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, principalmente na floresta latifoliada da bacia do Paraná. É uma árvore com aproximadamente 10 a 15 metros de altura, possui uma copa globosa densa com folhas compostas, sendo os seus folíolos alternados ou opostos. As flores são brancas, pequenas, hermafroditas, reunidas em panículas terminais. Os frutos são do tipo folículo com uma semente preta envolvida por um arilo de cor laranja (Figura 7). Este conjunto de características morfológicas do fruto indicam uma planta dispersa por animais, principalmente aves. Sua madeira é empregada na construção civil, para confecções de artigos esportivos e em ferramentas (PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS,2002; LORENZI, 1992).

O tronco desta espécie fornece o bálsamo ou óleo de copaíba, um líquido transparente, que é a seiva extraída mediante aplicação de furos no tronco até atingir o cerne. Este óleo possui diversas aplicações na área farmacêutica (LORENZI, 1992).

FIGURA 7 - FRUTOS E SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (copaíba)



A: Fruto de *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e B: Semente de *Copaifera langsdorffii* (copaíba)

FONTE: LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** São Paulo: Ed. Plantarum, 1992. p. 152.

1.7.2 *Hymenaea courbaril*

Segundo a classificação proposta por CRONQUIST (1988) a espécie *Hymenaea courbaril* pertence a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Caesalpiniacea e gênero Hymenae.

Esta espécie é conhecida popularmente como: jatobá, jataí, jataí-amarelo, jataí-peba, jataí-vermelho, jitaí, farinheira, jataíba, burandã, imbiúva, jatobá-miúdo e jatobá-da-catinga. É uma espécie nativa do Piauí até o Norte do Paraná na floresta semidecídua, tanto em solos de alta como média fertilidade. A altura da árvore varia de 15 a 20 metros, com tronco de até 1 metro de diâmetro. Sua madeira é empregada na construção civil, para confecções de utensílios esportivos e de ferramentas (LORENZI, 1992).

As folhas de coloração verde escura são compostas de dois folíolos brilhantes, de 6-14 cm de comprimento. As flores são pequenas, com pétalas brancas, pouco maiores do que o cálice. Seu fruto é uma vagem marrom avermelhada, medindo de 8 a 15 centímetros

de comprimento por 3 a 5 centímetros de largura. Apresenta consistência rígida, de forma arredondada e outras vezes achatada, contendo no seu interior de 3 a 6 sementes, a quais são envoltas por uma substância farinácea, compacta e comestível (LORENZI, 1992; RIZZINI, 1978; CARVALHO, 1994).

FIGURA 8 – FRUTO E SEMENTES DE *Hymenaea courbaril* (jatobá)

A B

A: Fruto de *Hymenaea courbaril* (jatobá) e B: Semente de *Hymenaea courbaril* (jatobá)

FONTE: LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** São Paulo: Ed. Plantarum, 1992. p. 155

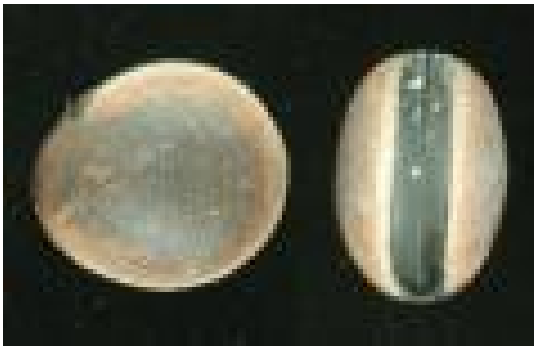
1.7.3 *Mucuna sloanei*

De acordo com CRONQUIST (1988) a espécie *Mucuna sloanei*, conhecida vulgarmente como Mucuna, pertence a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, subfamília Papilonoideae e gênero Mucuna.

Mucuna sloanei é uma erva trepadeira, cultivada juntamente com milho e inhame. Como outras espécie da ordem Fabales, ela produz muitos frutos por planta, sendo que o fruto possui de 1 a 8 sementes (Figura 9). A semente desta espécie tem sido utilizada por grávidas por suas propriedades medicinais para evitar aborto. Além disso, esta semente é geralmente utilizada como espessante em estados da Nigéria, sendo encontrada em Gana, Camarões, Senegal e Togo (AJIWE et al., 1997).

TEIXEIRA (2005) isolou o polissacarídeo presente na semente de *Mucuna sloanei*, além de isolar uma lectina, a qual mostrou-se capaz de aglutinar hemácias e ser inibida por açúcares contendo D-galactose.

FIGURA 9 - SEMENTES DE *Mucuna sloanei* (Mucuna)



FONTE: A Sea-Bean Guide: Hamburger Bean, www.seabean.com. Acesso em: 16 jun. 2005

1.7.4 *Theobroma cacao*

Considerando a classificação proposta por CRONQUIST (1988), a espécie *Theobroma cacao* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, família Sterculiaceae e gênero Theobroma.

Esta espécie é popularmente conhecida como cacau, cacaueiro e cacau-verdadeiro. Sua madeira tem pouca aplicabilidade, porém seus frutos são comestíveis, tanto *in natura* como industrializados (Figura 10). Seu principal valor está nas sementes, transformadas industrialmente no chocolate, o qual é consumido em todo o mundo. O Brasil é o principal produtor mundial, sendo que suas sementes são exportadas na forma de amêndoas secas. É cultivado principalmente na região Amazônica e na Bahia (LORENZI, 1992).

No processamento, a polpa que envolve as sementes é removida pelo processo de fermentação e é hidrolisada por microorganismos. Durante a fermentação a polpa fornece substratos para vários microorganismos sendo esta etapa essencial para o

desenvolvimento do sabor do chocolate, o qual é expresso posteriormente durante o processo de torrefação. O excesso da polpa pode ser utilizado na fabricação de geléias, álcool e vinagre, além de ser utilizada em sucos, licores, sorvetes e iogurte (LORENZI, 1992; FIGUEIRA et al., 1993).

Para cada tonelada de semente seca são obtidas 8 toneladas de casca, sendo este considerado um problema ambiental. A indústria de produtos derivados do cacau produz toneladas de casca, a qual é utilizada como ração animal, biogás e biofertilizante. As cinzas desta casca também são utilizadas na fabricação de sabão na Ghana e Nigéria (FIGUEIRA et al., 1993; CEPLAC, 2005).

Os polissacarídeos do cacau foram caracterizados pela primeira vez por WHISTLER et al. (1956), que encontraram diferenças entre os polissacarídeos solúveis em água quente da semente e de sua casca. Ambas as amostras apresentaram os mesmos monossacarídeos, porém em diferentes proporções de Rha: Ara: Gal: Man de 3,8: 1,3: 3,8: 1 na casca enquanto que na semente a proporção foi de 3: 2,3: 2: 1. BLAKEMORE et al. (1966) citado por FIGUEIRA et al. (1993) concluíram que a maior parte dos polissacarídeos solúveis em água quente presentes na casca do fruto do cacau eram pectinas. ADOMAKO (1972) isolou o material péctico, através de extração ácida, tanto da casca do fruto maduro como do fruto verde observando uma alta quantidade de ácido galacturônico (85%).

FIGUEIRA et al. (1994) compararam as gomas presentes no tronco em na casca do cacau e constataram altos percentuais de ácido urônico. A composição monossacarídica determinada por estes autores foi semelhante a goma karaya, porém as gomas do cacau apresentam uma maior quantidade de ramnose, ácido galacturônico e ácido glucurônico. A composição monossacarídica das gomas do cacau possuem similaridades, porém não são idênticas, sendo que na goma do tronco do cacau a proporção de Rha: Gal: Ara: Glc: GalA: GlcA é de 1,9: 1: 0,3: 2,8: 2,4: 1,2, enquanto que na goma da casca a proporção é de 1,9: 1: 0,2: 0,2: 4,2: 1,3. As análises reológicas mostraram que a goma karaya é mais viscosa que ambas as gomas do cacau.

A casca da semente do cacau apresenta uma grande quantidade (~40%) de fibras dietéticas constituída por lignina e carboidratos insolúveis. O material é formado por celulose (34%), pectina (40-45%) e por polímeros hemicelulósicos, contendo por galactoglucomanana (7- 10%), xiloglucana fucosilada (5-7%) e xilogalacturonana (4%). (MARTÍN-CABREJAS et al., 1994; REDGWELL et al., 2003).

A investigação dos polissacarídeos presentes nas sementes de cacau com e sem fermentação prévia foi realizada por REDGWELL; HANSEN (2000). Neste estudo os autores observaram que a composição monossacarídica das frações não-celulósicas não variou significativamente com a fermentação. A composição da parede celular destas sementes mostrou 60% de pectina, 28% de celulose, 8% de xiloglucana fucosilada e 3% de galactoglucomanana, sendo similar ao tecido parenquimatoso de muitas frutas e vegetais, diferentemente do que foi constatado em polissacarídeos de reserva de diferentes sementes.

FIGURA 10 - CACAUEIRO E CORTE TRANSVERSAL DO FRUTO DO CACAU

A B

A: Cacaueiro. B: Corte transversal do fruto do cacau, a seta indica a casca do fruto do cacau, a qual foi utilizada no presente trabalho.

FONTE: http://pt.wikipedia.org/wiki/Cacau. Acesso em 16 jun. 2005.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar xiloglucanas e testar frações homogêneas quanto a sua atividade biológica em macrófagos peritoneais de camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair xiloglucanas de reserva das sementes de *Copaifera langsdorffi* (copaíba), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Mucuna sloanei* (mucuna).

- Isolar xiloglucana estrutural da casca do fruto de *Theobroma cacao* (cacau).

- Testar os efeitos *in vitro* das frações homogêneas das xiloglucanas sobre macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de ânion superóxido na presença e na ausência de PMA e na produção de óxido nítrico.

- Avaliar os efeitos das frações homogêneas das xiloglucanas na atividade elicitora de macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de *Hymenaea coubaril* e *Copaifera langsdorffii* foram adquiridas no IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais).

As sementes de *Mucuna sloanei* foram doadas pelo Professor Renato Azevedo Moreira da Universidade Federal do Ceará.

3.2 OBTENÇÃO DA CASCA DO FRUTO DE *Theobroma cacao*

O fruto fresco de *Theobroma cacao* foi adquirido num mercado em Belém- PA. Amostras de casca congelada foram doadas pela Ceplac (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), Itabuna-BA.

3.3 ISOLAMENTO DOS COTILÉDONES DAS SEMENTES E INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

Sementes selecionadas de *Copaifera langsdorffi* (copaíba), *Hymenaea courbaril* (jatobá) e *Mucuna sloanei* (mucuna), foram submetidas a inativação enzimática em água fervente. As sementes foram submetidas a fervura em água por diferentes períodos de tempo para inativação enzimática por 15, 40 e 30 minutos, respectivamente. Após este processo, as sementes permaneceram por 12 horas na água de fervura a 4ºC. Seguindo a embebição os cotilédones foram separados manualmente. Depois de secos, os cotilédones foram moídos no moinho WILLYE TE-650 utilizando peneira de 40 mesh. As sementes moídas e secas foram deslipidificadas, com tolueno-etanol (2:1), por aproximadamente 15 horas, em aparelho extrator de Soxhlet. O resíduo deslipidificado e seco foi utilizado para posteriores extrações.

3.4 OBTENÇÃO DAS XILOGLUCANAS DE RESERVA

Os resíduos deslipidificados foram submetidos a uma extração com metanol-água (4:1) por trinta minutos em refluxo. Após esta extração, o material foi seco e submetido a sucessivas extrações aquosas a temperatura ambiente, por uma hora com agitação mecânica. Em seguida, as soluções foram centrifugadas no equipamento SORVALL T6000D a 8000 rpm por 20 minutos separando-se o extrato viscoso do resíduo. O polissacarídeo foi então precipitado utilizando dois volumes de etanol comercial. O material precipitado foi lavado duas vezes com etanol absoluto e então seco em estufa a vácuo.

As frações resultantes destas extrações foram denominadas 1, 2, 3 e 4 seguindo a sigla XG (xiloglucana) além da letra inicial do nome comum da espécie da qual foi isolada. Assim XGM1 representada o material obtido na primeira extração aquosa das sementes de mucuna.

3.5 ISOLAMENTO DA CASCA DOS FRUTOS DE CACAU E INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA.

Os frutos foram selecionados, lavados e pesados. Cada fruto foi cortado ao meio e o conteúdo presente no seu interior removido. As cascas dos frutos foram então trituradas em liqüidificador com a solução de metanol-água (4:1). Posteriormente, este material foi submetido a uma extração em refluxo por trinta minutos, para inativação das suas enzimas endógenas. A casca moída e seca foi deslipidificada em aparelho Soxhlet usando uma mistura tolueno-etanol (2:1).

3.6 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA CASCA DO FRUTO

O material deslipidificado e seco foi submetido a duas extrações aquosas a temperatura ambiente e uma a quente em banho-maria a 50 ºC, cada uma por duas horas

sob agitação. Os extratos obtidos após centrifugação foram precipitados com etanol (três volumes).

A seguir, foram realizadas sucessivas extrações alcalinas com concentrações crescentes de álcali na presença de $NaBH_4$. Inicialmente o material foi tratado com Na_2CO_3 0,05M a 4ºC. Seqüencialmente, foram realizadas três extrações com KOH 1M, seguida de três extrações com KOH 4M, sob atmosfera de nitrogênio. As frações extraídas com KOH foram tratados com solução de ácido acético 50 % (v/v) até pH 5,0, o que resultou na precipitação das frações denominadas hemicelulose A (HA), as quais foram separadas por centrifugação, lavadas sucessivamente com etanol absoluto e secas na estufa a vácuo. Para a identificação da fração utilizou-se o número correspondente a ordem da extração após a sigla HA. Os sobrenadantes foram dialisados por 72 horas, contra água corrente, concentrados em evaporador rotatório, em temperatura inferior a 50ºC e então tratados com três volumes de etanol comercial para precipitação da fração denominada hemicelulose B. O mesmo padrão de nomenclatura acima descrito foi atribuído aos precipitados correspondentes a hemicelulose B (HB).

3.7 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

As dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método de fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando padrão de glucose em concentrações de 20-100 µg/mL e leitura realizada em comprimento de onda de 490 nm.

As dosagens de proteína foram realizadas pelo método de Hartree (1972) e Peterson (1977), usando como padrão albumina bovina nas concentrações de 20-100 µg/mL e leitura realizada em comprimento de onda de 650 nm.

Os ácido urônicos foram dosados pelo método do m-hidroxibifenil, desenvolvido por Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), sendo as leituras efetuadas em 520 nm, utilizando como padrão ácido glucurônico, em concentrações de 20-100 µg/mL e como branco solução de glucose a 50µg/mL.

3.8 FRACIONAMENTO POR CONGELAMENTO E DEGELO

O polissacarídeo da fração HB-8 foi solubilizado em água destilada e submetido ao processo de congelamento e posterior degelo a temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (9000 rpm, 15 minutos a 25ºC).

3.9 PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FEHLING

A fração HB-8 foi tratada com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução é formada por duas soluções A e B (1:1). A solução A é composta por 173 g de tartarato de potássio e sódio, 125 g de KOH e quantidade de água destilada suficiente para completar o volume de 500 mL. A solução B é composta por 55,7 g de sulfato de sódio pentaidratado e quantidade de água destilada suficiente para completar o volume de 500 mL.

Adicionou-se à fração HB-8 solubilizada em água o mesmo volume da solução de Fehling (A+B) e após vigorosa agitação o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas. Após este tempo determinado, o precipitado formado foi separado por centrifugação (9000 rpm, 15 minutos a 25ºC). O sobrenadante foi neutralizado com ácido acético e dialisado contra água corrente por 72 horas. O precipitado formado foi ressuspenso em água destilada e deionizado por resina Dowex na forma catiônica. Após as frações foram concentradas no evaporador rotatório e então liofilizadas.

3.10 FRACIONAMENTO POR DIÁLISE EM MEMBRANA

A fração HB-8 após fracionamento por cromatografia de troca iônica foi submetida a diálise fechada por aproximadamente 48 horas em membrana com limite de exclusão de 16kDa.

3.11 CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA

A fração HB-8 foi submetida a cromatografia em coluna de troca-iônica DEAE-Trisacryl Plus M (forma Cl^-) de 20 cm x 3,8 cm (d.i). O material de interesse foi eluído com água deionizada. As frações coletadas eram monitoradas pelo método de fenol – ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A fração eluída com água foi concentrada em evaporador rotatório e liofilizada.

3.12 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

3.12.1 Hidrólises ácidas totais

As hidrólises ácidas foram realizadas por dois métodos:

a- TFA 1 M, durante 5 horas a 100 ºC. Ao término da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989).

b- H_2SO_4 72 % (p/p), durante 1 hora, em banho de gelo, seguido de diluição para 8%, a 100 ºC por aproximadamente 6 horas. Ao final da hidrólise o ácido foi neutralizado com carbonato de bário e o sal resultante removido por filtração (BIERMANN, 1989).

3.12.2 Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise

Os monossacarídeos resultantes das hidrólises (10 mg) foram reduzidos com boroidreto de sódio ($NaBH_4$), por aproximadamente 12 horas, em meio aquoso, a 25 ºC (WOLFROM e THOMPSON, 1963 a). Após a redução, o material foi tratado com resina catiônica (forma H^+) para a remoção do cátion sódio (Na^+) e decomposição do excesso do agente redutor. Em seguida o material foi filtrado e evaporado até a secura. Foram realizadas três lavagens sucessivas com aproximadamente 2 mL metanol para a remoção

do ácido bórico remanescente por co-destilação com metanol, na forma de borato de trimetila. Após completa secura, os alditóis foram acetilados com anidrido acético e piridina na proporção 1:1 v/v, durante 12 horas a temperatura ambiente (25 ºC) (WOLFROM e THOMPSON, 1963 b). Este processo foi interrompido com a adição de gelo picado e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual na fase clorofórmica foi eliminada com sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% e água de forma intercalada. A fase clorofórmica foi lavada diversas vezes com água destilada, evaporada a 25ºC para posterior análise por cromatografia líquido-gasosa (GLC) ou por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (SLONEKER, 1972).

3.13 CROMATOGRAFIA EM PAPEL

As análises por cromatografia em papel foram feitas pela técnica ascendente, em papel Whatman nº 1, utilizando o sistema de solvente benzeno-*n*-butanol-piridina-água na proporção 1:5:3:3 v/v/v. Os cromatogramas foram revelados em nitrato de prata alcalino. (TREVELYAN et al., 1950).

3.14 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC) E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

Para as análises de GLC foi utilizado um cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 A II, equipado com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2 mL/min. Utiliza-se uma coluna capilar [30 m x 0,25 mm (d.i.)] DB-225, com espessura de filme 0,25 μm, sendo a temperatura do detector 300 ºC e do injetor 250 ºC.

As análises por GC-MS foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN-MAT, modelo ITD 800, equipado com colunas capilares de sílica fundida (30 m X 0,25 mm di) revestidas DB-225 ou DB- 210. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50ºC (mantida

por 1 min), seguindo-se um aumento gradual de 40ºC/min até 220ºC, sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Foi utilizado hélio ultra puro como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min

3.15 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER MULTI ÂNGULOS (MALLS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI)

As amostras foram solubilizadas em água MilliQ ou solução de $NaNO_2$ 0,1 M contendo 200 ppm de NaN_3 para obter como concentração polissacarídica final de 1 mg/mL e então foram filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,2μm. As análises foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com 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 WATERS em série, com limites de exclusão de 1×10^6, 4×10^5, 8×10^4 e 5×10^3. O eluente utilizado foi uma solução de $NaNO_2$ 0,1 M contendo NaN_3 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min, pressão de 920 psi a 25 ºC, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) foi determinada para as amostras homogêneas, sendo que para cada amostra foram utilizadas 5 concentrações. Para isto, foi preparada uma solução na concentração 1 mg/mL em $NaNO_2$ 0,1 M contendo NaN_3 (200 ppm), filtrada em membrana de 0,2 μm, sendo então diluída nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg/mL.

3.16 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NOS PROCEDIMENTOS UTILIZANDO MACRÓFAGOS

3.16.1 Solução das xiloglucanas estudadas

Para os testes de atividade biológica, as soluções das xiloglucanas isoladas dos cotilédones das sementes de *Mucuna sloanei* (XGM), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Copaifera langsdorffi* (XGC) foram solubilizadas em solução de PBS pH 7,4 na concentração de 10mg/mL. As soluções foram esterilizadas em autoclave (Fanen) a 120ºC, durante 30 minutos. Posteriormente as soluções foram diluídas em meio de cultura ou HBSS estéril para as concentrações adequadas para cada experimento.

3.16.2 Solução salina tamponada (PBS)

A solução salina tamponada (PBS) em pH 7,4 foi preparada como solução estoque cinco vezes concentrada, sendo constituída por: Na_2PO_4 40,5 mM, KH_2PO_4 7,3 mM e NaCl 680mM. Esta solução concentrada foi esterilizada em autoclave (Fanen) a 120ºC, durante 30 minutos e armazenada a 4ºC. Para o uso, a solução foi diluída com água MilliQ estéril.

3.16.3 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) (HANKS; WALLACE, 1949) foi preparada através da mistura de duas soluções A e B, a quais foram preparadas na forma de soluções estoque vinte vezes concentradas. A solução A era constituída por NaCl 2,737 M, KCl 104 mM, $CaCl_2$ 19,7 mM e $MgSO_47H_2O$ 16,2 mM e a solução B apresentava como constituintes Na_2HPO_4 8,4 mM, KH_2PO_4 8,7 mM, glucose 100 mM. As duas soluções foram misturadas e diluídas com água bidestilada ou água milliQ e seu pH ajustado para 7,4. A solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poros de 0,22µm em câmara de fluxo laminar (VECO).

3.16.4 Meio de cultura

O meio mínimo essencial (MEM) (EAGLE, 1959) foi reconstituído em água milliQ e esterilizado por filtração sob pressão com membrana de acetato de celulose estéril com poro de 0,22µm. Este meio foi suplementado com HEPES estéril com concentração final de 10mM, 5% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 µg/mL de gentamicina e seu pH foi ajustado a 7,4 com solução estéril de bicarbonato de sódio a 0,1 M.

3.17 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*) com aproximadamente dois meses de idade. Estes animais foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sendo alimentados com ração apropriada e água a vontade. Os animais foram utilizados com a autorização do Conselho de Ética em Experimentação Animal (CEEA), protocolado com o número 132 do processo 31588/05-44 (anexo).

Para a obtenção dos macrófagos os camundongos foram mortos por asfixia, com éter etílico em câmara de vidro. Após assepsia com álcool iodado e exposição do peritônio, 5 mL de PBS a temperatura ambiente foram injetados na cavidade peritoneal com auxilio de seringa e agulha estéreis. Em seguida, realizou-se uma massagem vigorosa na região inoculada, as células do exsudato peritoneal foram aspiradas e transferidas para um tubo plástico estéril, sendo mantidas em banho de gelo até a utilização. Posteriormente, as células foram centrifugadas (HITACHI CR21E) a 480 por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi desprezado e o "pellet" de células foi ressuspenso em meio MEM.

A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, e a seguir, as células foram plaqueadas em placa de cultura estéril de 96 poços a uma densidade de 5×10^5

células por poço e colocadas para aderir durante uma hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2.

Após a aderência as células foram lavadas duas vezes com PBS a 37ºC. Por este procedimento acima 90% do total de células aderidas são macrófagos, não havendo necessidade de purificação (ADAMS, 1979). Após esta etapa, as condições dos experimentos variaram de forma adequada para cada situação experimental. As monocamadas de células foram rotineiramente observadas em microscópio invertido (OLYMPUS MOD. CK2)

3.18 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT

Para determinação da viabilidade celular utilizou o método descrito por REILLY et al. (1998), onde o MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) avalia o estado funcional da cadeia respiratória. As células metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO com uma coloração roxa característica.

Nesta avaliação os macrófagos peritoneais já aderidos foram lavados duas vezes com PBS estéril e foi adicionado meio MEM contendo os polissacarídeos nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 μg/mL. Estas preparações foram incubadas por 2 ou 48 horas. Em seguida, removeu-se o meio e adicionou-se 180 μL de HBSS com 20 μL de solução de MTT em HBSS (5 mg/mL), obtendo uma concentração final em MTT de 500 μg/mL. A placa foi incubada por mais três horas a 37 ºC em atmosfera de 5 % de CO_2. Ao término da incubação o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan, que precipitaram sobre as células viáveis, foram dissolvidos em DMSO. A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark, utilizando comprimento de onda de 550 nm, sendo o branco o DMSO.

3.19 DOSAGEM DE ÂNION SUPERÓXIDO LIBERADO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS, ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C.

Para avaliar a produção de ânion superóxido pelos macrófagos foi utilizado um protocolo baseado no descrito por SASADA *et al*. (1983). Neste procedimento a presença de ânion superóxido foi medida através da redução extracelular do citocromo c. As células do exsudato peritoneal dos camundongos foram plaqueadas e aderidas como já descrito, adicionou-se o meio de reação composto por citocromo c (80 μM) em HBSS mais os polissacarídeos, nas concentrações finais de 25, 50, 100, 250 e 500 μg/mL. Como controle positivo, macrófagos foram incubados na presença de PMA (1μg/mL).

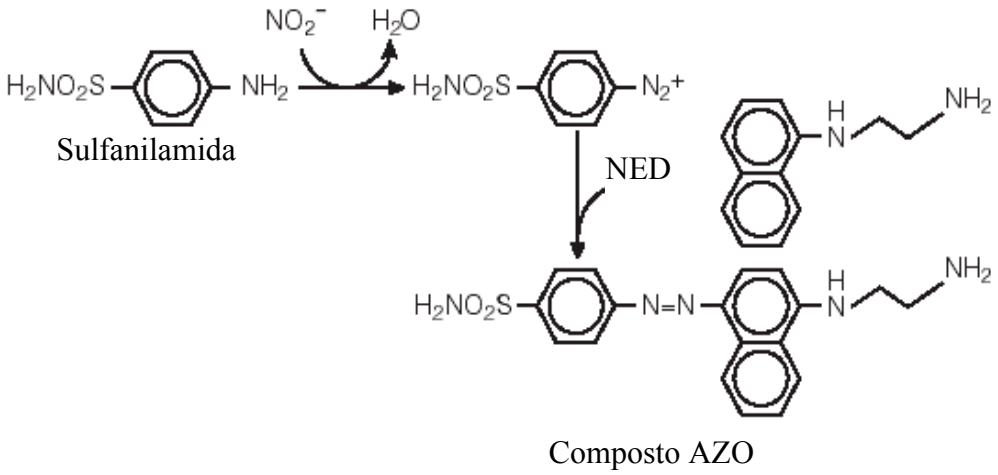
Após duas horas de incubação a 37 ºC em atmosfera de 5 % de CO_2, o meio de reação foi transferido cuidadosamente para outra placa de 96 poços e a absorbância foi medida a 550 nm, em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark, utilizando como branco (HBSS + citocromo c). As concentrações de ânion superóxido, correspondente à concentração de citocromo c reduzido, foram determinadas utilizando o Coeficiente de Extinção Molar ($C_{oxid.red.}\Delta\varepsilon = 2,1 \times 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$): $C=A/\varepsilon$ (JOHNSTON et al., 1978). A concentração de ânion superóxido produzido foi expressa por mg de proteína.

3.20 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO PRODUZIDO POR MACRÓFAGOS ISOLADOS DA CAVIDADE PERITONEAL

Como o óxido nítrico possui um tempo de meia vida muito curto, a determinação da produção deste radical por macrófagos é mensurado pela formação do nitrito (NO_2^-), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito foi realizada pelo método de Griess no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de

coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm (GREEN et al., 1982; SUN et al., 2003).

FIGURA 11 - REAÇÃO DE DOSAGEM DE NITRITO COM O REAGENTE DE GRIESS



FONTE: PROMEGA. Tecnical Bulletin Griess Reagent System – instruction for use of product G2930. Disponível em:www.promega.com/tbs Acesso em: 10 dez. 2005.

Neste trabalho foi utilizado o seguinte protocolo para a dosagem de nitrito: o reagente de Griess foi preparado pela mistura de duas soluções na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A primeira solução era constituída por naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a outra solução por sulfonamina *p*-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v) (GREEN et al., 1982).

Para a avaliação da produção de óxido nítrico os macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram plaqueados na densidade de 5 X 10^5 células por poço em placas de cultura de 96 poços e incubados para aderência, conforme o procedimento descrito anteriormente. Aos macrófagos aderidos foram adicionadas as xiloglucanas dissolvidas em meio nas concentrações previamente determinadas pela viabilidade celular. Para as xiloglucanas XGJ e XGC foram utilizadas as concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL e para a

XGM utilizou-se as concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL. Como controle positivo da ativação da produção de óxido nítrico foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (0110:B4 – SIGMA) na concentração de 50 ng/mL.

As células foram incubadas por 48 horas a 37 ºC em atmosfera de 5% de CO_2. Após este tempo de incubação 100 µL do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e adicionou-se 100 µL do reagente de Griess. Após a incubação por dez minutos a absorbância foi medida em 550 nm, em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark, utilizando como branco meio mais o reativo de Griess. A concentrações de nitrito foram determinadas utilizando uma curva padrão de $NaNO_2$.

Alternativamente as xiloglucanas, nas mesmas condições, foram previamente tratadas com polimixina B (50 µg/mL) por 40 minutos antes de serem adicionados aos macrófagos. Os resultados foram expressos em µmol de NO produzido por mg de proteína.

3.21 EFEITO DAS XILOGLUCANAS NA CAPACIDADE ELICITORA DE MACRÓFAGOS

A capacidade elicitora de macrófagos frente às xiloglucanas foi determinada como descrito por MORETÃO et al. (2004). Soluções estéreis dos polissacarídeos XGC, XGJ e XGM foram injetadas na cavidade peritoneal dos camundongos, nas concentrações de 100 ou 200 mg/Kg em 0,5 mL de PBS. Foram utilizados grupos de 4 camundongos fêmeas por dose e o grupo controle recebeu 0,5 mL de PBS. Após 24 horas os camundongos foram mortos por asfixia, com éter etílico em câmara de vidro. As células foram coletadas como já descrito e após centrifugação foram ressuspensas com meio MEM e contadas em câmara de Neubauer em microscópio invertido (OLYMPUS, MOD. KW1). Os resultados foram expressos em nº de células totais.

3.22 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS DE MACRÓFAGOS

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de BRADFORD (1976) com algumas modificações. A solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 foi preparada pela dissolução de 40 mg do corante em 20 mL de etanol absoluto, 40 mL de ácido orto-fosfórico a 85 % (v/v) e água bidestilada até o volume de 100 mL. A solução ficou em repouso por 12 horas à aproximadamente 5ºC e depois foi filtrada em papel de filtro comum. Antes do uso essa solução foi diluída em água destilada na proporção 1:4.

Após a leitura do sobrenadante em cada experimento, as monocamadas de células aderidas foram lavadas quatro vezes com PBS para remoção do meio residual. Em seguida, adicionou-se 100 μL de solução 0,2 % (v/v) de Triton-X 100 em cada poço e as células foram incubadas a 37 ºC por uma hora. A seguir cada poço contendo os macrófagos foi raspado e homogeneizado com cuidado para não formar espuma. Em seguida, transferiu-se 10 μL de cada poço para tubos de ensaio, adicionando-se 0,5 mL do reativo de Bradford diluído. Após 5 minutos, 200 μL da mistura foram transferidos para placas de 96 poços e a absorbância foi determinada em 595 nm em leitor de microplacas, utilizando-se como branco uma solução contendo triton X-100 (0,2%).

3.23 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes de atividade biológica *in vitro* foram submetidos à análise de variância ANOVA (fator duplo ou fator único) e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (média ± DP) ou como média ± erro padrão (média ± EP) de no mínimo três experimentos em triplicatas. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p \leq 0,05$.

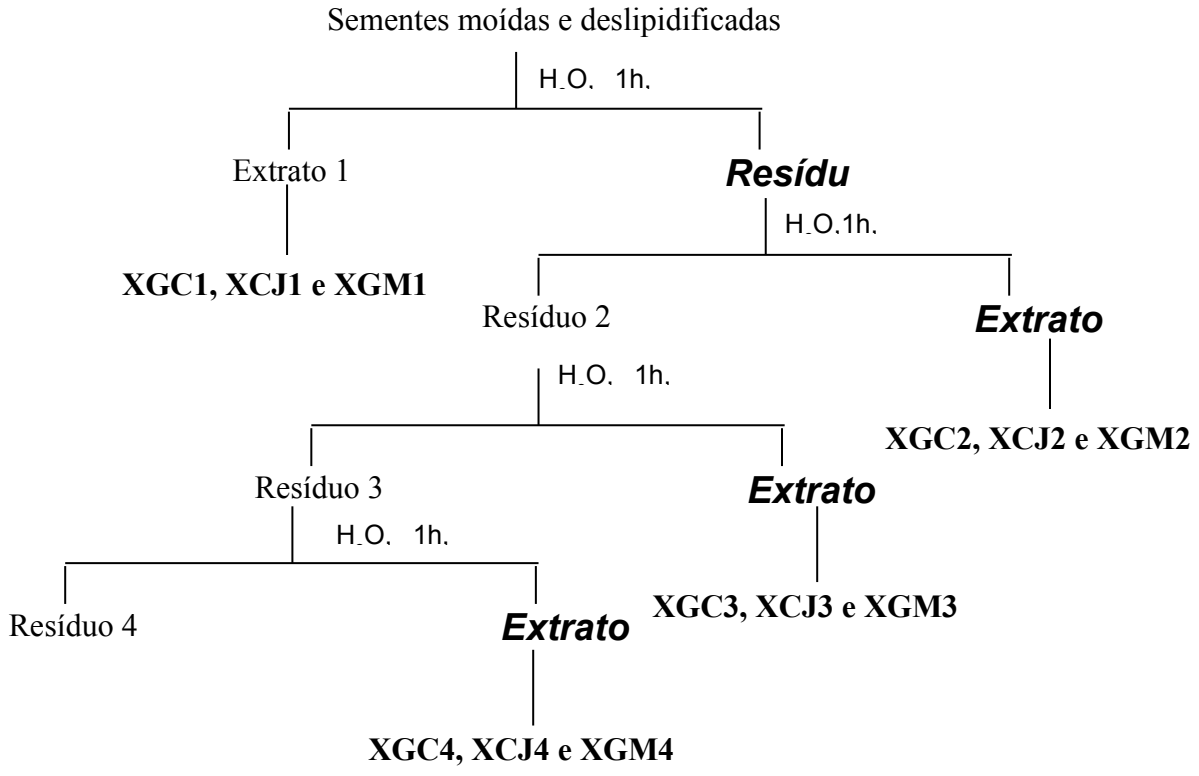
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS SEMENTES DE *Copaifera langsdorffi*, *Hymenaea courbaril* E *Mucuna sloanei*

As xiloglucanas das sementes de *Copaifera langsdorffi* (copaíba), *Hymenaea courbaril* (jatobá) e *Mucuna sloanei* (mucuna) foram extraídas com água a temperatura ambiente conforme descrito na metodologia, item 3.4, pág 35 sendo apresentado abaixo o fluxograma de extrações (Figura 12).

Foram feitas quatro extrações aquosas seqüenciais, as quais originaram os extratos 1, 2, 3 e 4. Após precipitação com etanol foram obtidas frações polissacarídicas que foram denominadas XG seguindo a inicial do nome comum da espécie utilizada e o número referente a extração. Por exemplo, a fração obtida para a copaíba a partir da primeira extração aquosa foi denominada XGC1.

FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE XILOGLUCANAS PRESENTES EM SEMENTES DE COPAÍBA, JATOBÁ E MUCUNA.



As frações obtidas foram analisadas quanto ao teor de açúcar total e proteína. Os resultados estão mostrados na Tabela 1. Para a copaíba e jatobá as frações polissacarídicas obtidas nas duas primeiras extrações apresentaram alta porcentagem de carboidratos e teores de proteína desprezíveis.

As frações polissacarídicas provenientes das sementes de mucuna apresentaram valores maiores de proteína quando comparada aos outros polissacarídeos, variando de 4,3 a 7,5 %. TEIXEIRA (2005) isolou xiloglucanas solúveis em água da semente de mucuna com conteúdos de proteína que variaram de 3,3 a 19,2%.

TABELA 1 – RENDIMENTO E CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE COPAÍBA, JATOBÁ E MUCUNA

Frações	Rendimento [a](%)	Açúcar total [b] (%)	Proteínas [c] (%)
XGC1	8,0	97	0
XGC2	3,9	97,2	0,6
XGC3	3,0	50,8	8,3
XGC4	2,3	73,9	6,7
XGJ1	16,6	99,4	0
XGJ2	8,1	95,5	0
XGJ3	6,1	54,4	2,8
XGJ4	3,9	62,5	2,6
XGM1	3,8	79,1	4,3
XGM2	2,1	80,5	5,4
XGM3	1,8	62,3	7,5
XGM4	1,2	71,4	5,9

(a): em relação às sementes deslipidificadas.
(b): Método de DUBOIS et al. (1956)
(c): Método de HARTREE (1972)

A análise da composição monossacarídica das frações obtidas (Tabela 2) mostrou a presença de glucose como componente majoritário, seguido de xilose e galactose, confirmando a presença de xiloglucanas. Pequenas quantidades de arabinose (na maioria dos casos inferior a 1%) também foi observada. A presença de arabinose em frações polissacarídicas contendo xiloglucana tanto de reserva como estrutural é bastante comum (LIMA et al., 1993; LIMA et al., 1995; YORK et al., 1996; VINCKEN et al., 1997; WATT et al., 1999; BUSATO, VARGAS-RECHIA, REICHER, 2001; ONWELUZO, RAMESH, THARANATHAN, 2002; JIA et al., 2003; FREITAS et al., 2005, YASHODA, PRABHA, THARANATHAN, 2005). Acredita-se que a arabinose seja um contaminante, uma vez que nenhum oligossacarídeo contendo arabinose foi isolado destas espécies.

As frações obtidas das sementes de copaíba apresentam uma composição monossacarídica característica de xiloglucanas, com proporção Glc: Xyl: Gal em média de 2,5: 1,5: 1,0. O mesmo foi observado por BUCKERIDGE et al. (1992), que caracterizaram estruturalmente as xiloglucanas de *Copaifera langsdorffii* e obtiveram uma proporção Glc: Xyl: Gal de 2,7: 1,9: 1,0 e 2,4:1,6:1,0, dependendo da procedência das sementes. Neste estudo os autores compararam a composição monossacarídica desta espécie com a xiloglucana de *Tamaridus indica* e observaram uma grande similaridade com uma proporção de 2,9: 2,1:1,0 (BUCKERIDGE et al., 1992). Ao analisar os oligossacarídeos obtidos com celulase estes autores obtiveram quatro oligossacarídeos: XXXG, XLXG, XXLG e XLLG, presentes na copaíba e tamarindo em diferentes proporções, indicando diferenças na estrutura fina dos polímeros.

WANG et al. (1996) isolaram uma xiloglucana das sementes de *Detarium senegalense* com proporção Glc: Xyl: Gal de 2,7: 1,9: 1,0. Entretanto, apesar destes autores terem utilizado cotilédones isolados, a fração contendo xiloglucana apresentou 92% de açúcar total após tratamento com protease e contaminação por pequenas quantidades de ácido urônico, manose e arabinose.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÕES AQUOSAS DAS SEMENTES DE COPAÍBA, JATOBÁ E MUCUNA

	Composição monossacarídica [a] Mol (%)			
Fração	Ara	Xyl	Gal	Glc
XGC1	1,2	29,2	19,9	49,6
XGC2	0,8	29,6	20,0	49,6
XGC3	0,7	28,4	20,1	50,8
XGC4	0,6	28,4	19,1	51,9
XGJ1	0,0	32,4	14,0	52,7
XGJ2	0,8	36,7	12,9	49,7
XGJ3	0,6	34,8	13,6	51,1
XGJ4	4,5	34,8	14,0	46,6
XGM1	0,7	31,3	19,6	48,1
XGM2	0,6	32,9	18,3	48,2
XGM3	0,5	28,5	19,7	51,3
XGM4	0,5	32,2	14,0	53,2

(a): Açúcares neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis.

As frações XGJ1-XGJ3, obtidas das sementes de jatobá apresentaram uma proporção Glc: Xyl: Gal em torno de 3,8: 2,6: 1,0. A proporção obtida é semelhante àquela determinada por LIMA et al. (1993) (3,6: 2,6: 1,0) para xiloglucana isolada da mesma espécie e ao polissacarídeo obtido por BUCKERIDGE et al. (1997) (3,3: 2,8: 1,0).

A análise da composição monossacarídica da fração XGM1 obtida das sementes de mucuna indicou uma proporção Glc: Xyl: Gal de 2,5: 1,6: 1,0. Esta proporção difere daquela determinada por TEIXEIRA (2005), que obteve uma razão de 1,8: 1,7: 1,0 mostrando uma menor quantidade de glucose, que poderia ser conseqüência de uma hidrólise incompleta do polissacarídeo. Os resultados são semelhantes aos obtidos por ONWELUZO; RAMESH; THARANATHAN, (2002) para *Mucuna flagellipes* que obtiveram uma proporção Glc: Xyl: Gal de 2,8: 1,5: 1 e traços de arabinose.

As xiloglucanas foram analisadas por HPSEC-MALLS/RI para análise de homogeneidade (Figuras 13-15). Pode-se observar que, todas as frações apresentaram-se homogêneas. Para as frações XGC1, XGJ1 e XGM1 foram determinados os valores de

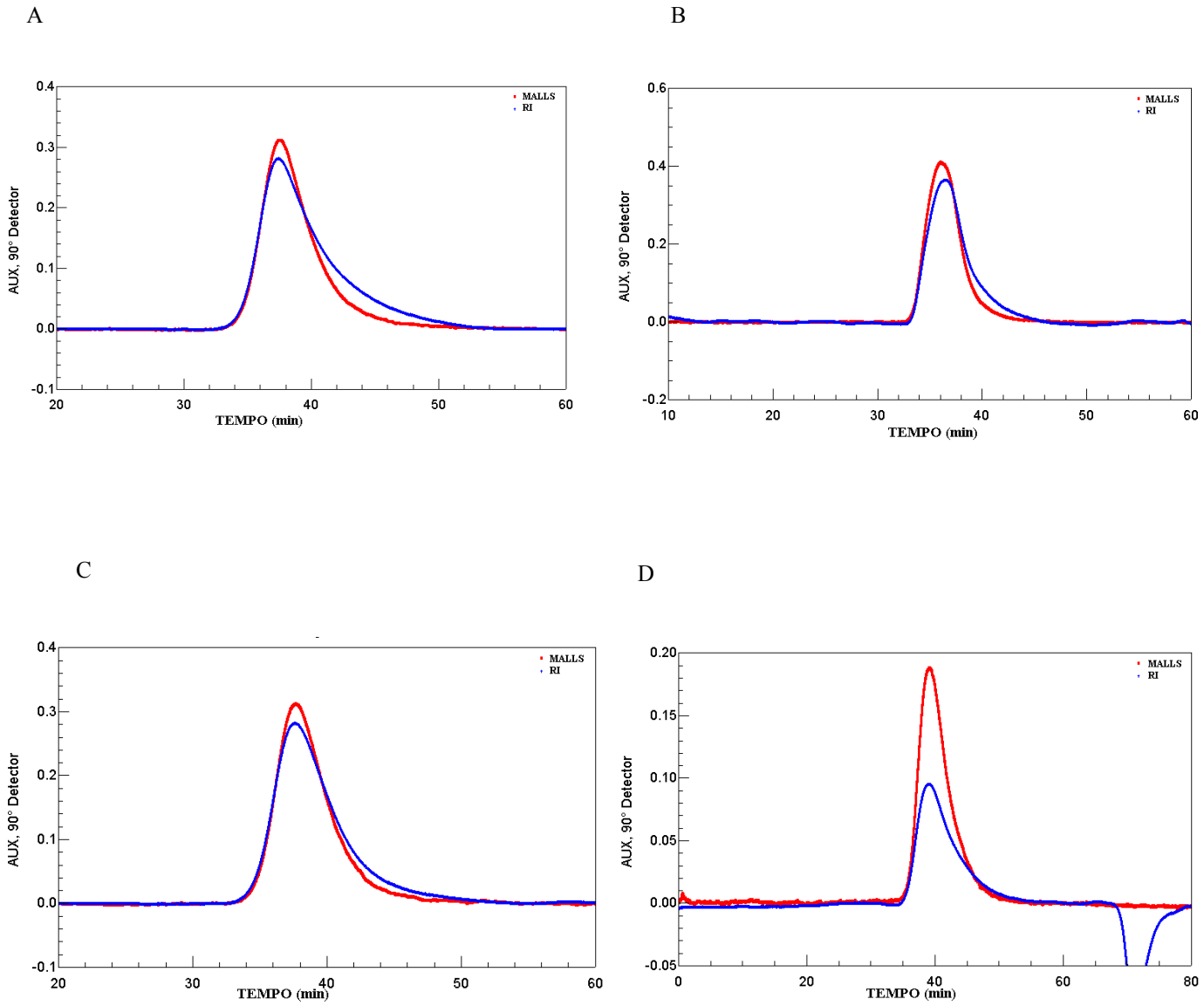
dn/dc. O valor obtido para XGJ1 foi de 0,3 mL/g. A partir dos valores de *dn/dc* e dos perfis de eluição foram determinados os valores de massa molar ponderal média (*Mw*). Para a fração XGJ1 obteve-se *Mw* de 2,0 X 10^5 g/mol. Este valor aproxima-se do valor determinado por MARTIN et al. (2003), e é inferior àqueles obtidos por FREITAS et al. (2005) para xiloglucanas isoladas das sementes da mesma espécie. Entretanto, PICOUT et al. (2003) demonstraram utilizando xiloglucanas de tamarindo e *Detarium senegalense*, que os altos valores de *Mw* encontrados muitas vezes, podem ser conseqüência, da presença de agregados moleculares. Mais recentemente, FREITAS et al. (2005) demonstraram que, alterações nas condições de preparo das soluções de xiloglucana de jatobá, tais como um aquecimento à 85ºC seguido de resfriamento, resultavam em drástica redução nos valores de *Mw*, de 1,5 X 10^6 para 8,7 X 10^5.

Os polissacarídeos XGC1 (obtido das sementes de copaíba) e XGM1 (isolado das sementes de mucuna) apresentaram valores de *dn/dc* 0,3 mL/g e 0,4mL/g e *Mw* de 1,6 X 10^5g/mol e 1,5 X 10^5 g/mol, respectivamente.

Os resultados obtidos sugerem que o protocolo de extrações utilizado com tempos curtos de extração foi adequado para obtenção de xiloglucanas homogêneas, praticamente isentas de proteínas e menos susceptíveis a formação de agregados moleculares.

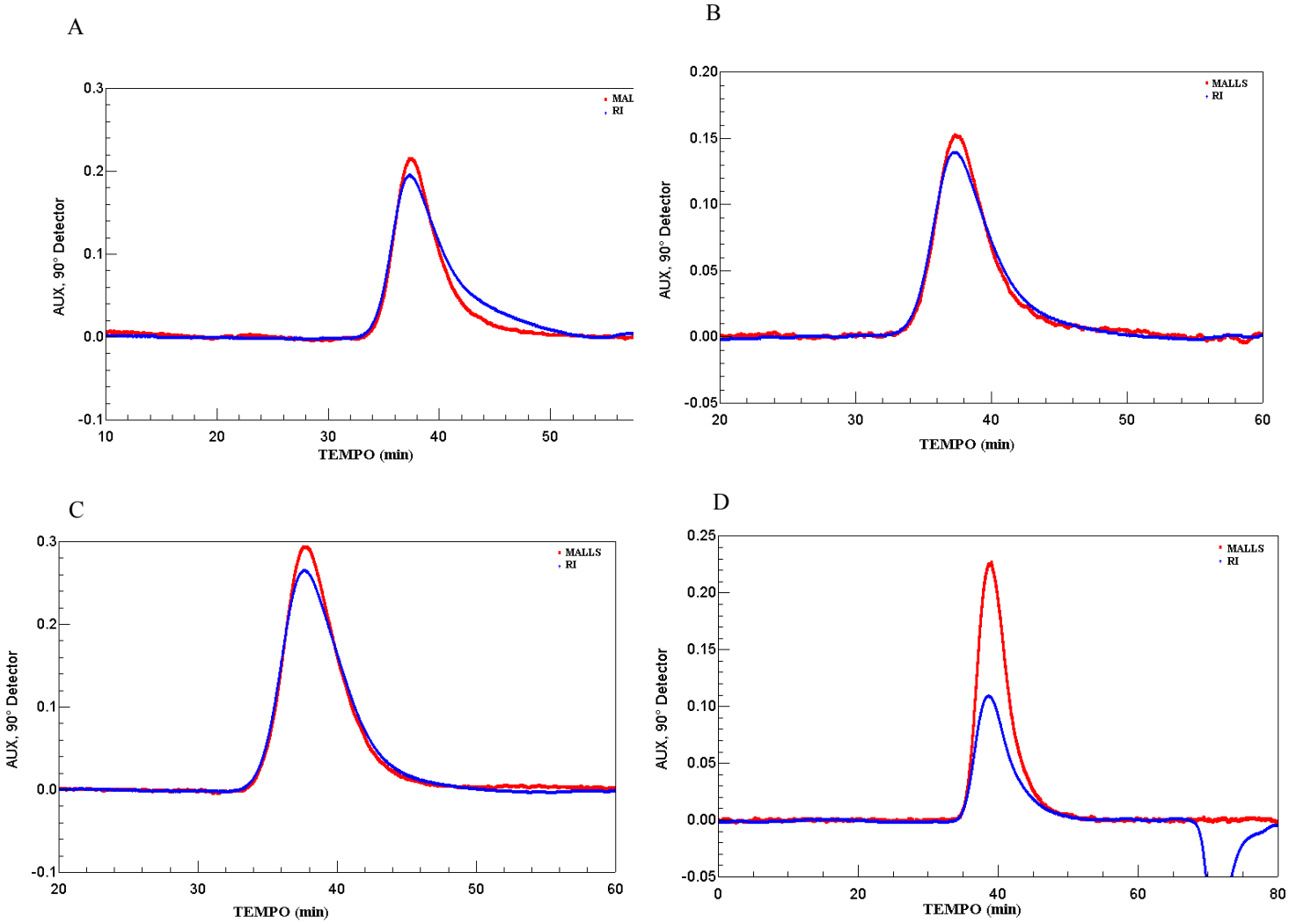
As xiloglucanas XGJ1, XGC1 e XGM1 foram reservadas para testes de atividade biológica.

FIGURA 13 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI PARA AS XILOGLUCANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE COPAÍBA



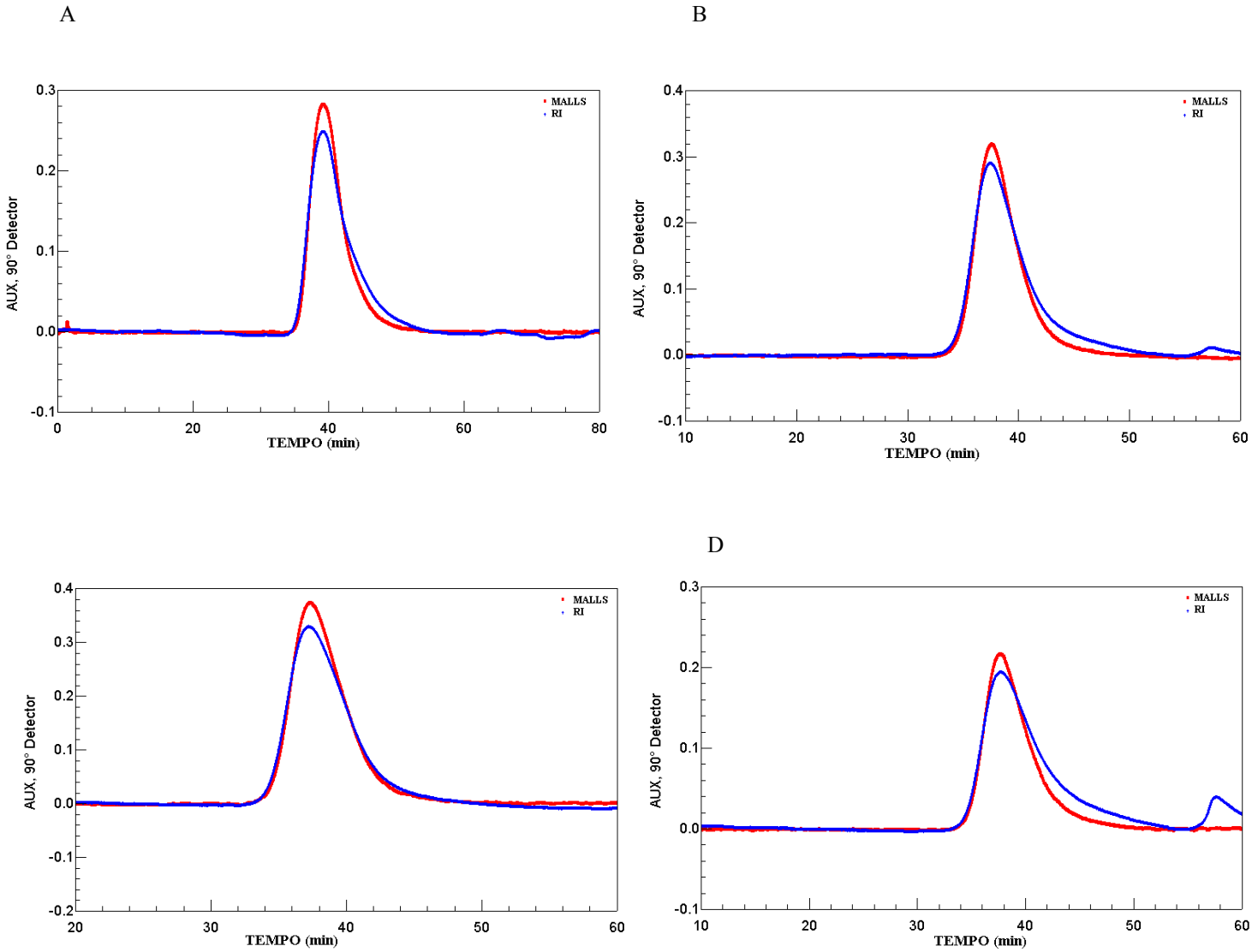
NOTA: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI para as xiloglucanas obtidas por extração aquosa das sementes de copaíba. (A) XGC1, (B) XGC2; (C) XGC3 e (D) XGC4 (RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo 90º indicado em vermelho)

FIGURA 14 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI PARA AS XILOGLUCANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE JATOBÁ



NOTA: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI para as xiloglucanas obtidas por extração aquosa das sementes de jatobá. (A) XGJ1, (B) XGJ2; (C) XGJ3 e (D) XGJ4 (RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo 90º indicado em vermelho).

FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI PARA AS XILOGLUCANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE MUCUNA



NOTA: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI para as xiloglucanas obtidas por extração aquosa das sementes de mucuna. (A) XGM1, (B) XGM2; (C) XGM3 e (D) XGM4 (RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo 90º indicado em vermelho)

4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA CASCA DO FRUTO DE *Theobroma cacao*

Após a obtenção das xiloglucanas de reserva das sementes, partiu-se para o isolamento de uma xiloglucana estrutural. Devido a grande disponibilidade de casca de cacau no Brasil, um subproduto da indústria, este material foi escolhido como fonte de parede celular vegetal para isolamento da xiloglucana estrutural.

As cascas dos frutos moídas, após inativação enzimática e deslipidificação, foram submetidas a diversas extrações seqüenciais como demonstrado na Figura 16.

As extrações aquosas a temperatura ambiente e a quente originaram as frações 1, 2 e 3, respectivamente. A extração com Na_2CO_3 0,05M deu origem a fração 4.

Para obtenção das hemiceluloses foram realizadas extrações alcalinas seqüenciais com KOH 1M e KOH 4M. Para cada concentração foram efetuadas três extrações consecutivas, resultando nas frações 5, 6 e 7 (extraídas com KOH 1M) e 8, 9 e 10 (extraídas com KOH 4M). Os extratos alcalinos foram fracionados em hemicelulose A e hemicelulose B. A hemicelulose A foi obtida por acidificação dos extratos alcalinos até pH 5, gerando as frações HA5, HA6, HA7, HA8, HA9 e HA10. Após precipitação da hemicelulose A, os sobrenadantes dialisados, concentrados e precipitados com etanol, originaram as frações correspondentes a hemicelulose B (HB5, HB6, HB7, HB8, HB9 e HB10).

O rendimento, o conteúdo de açúcar total e proteína das frações obtidas estão indicados na Tabela 3.

FIGURA 16 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA CASCA DO FRUTO DE *Theobroma cacao*

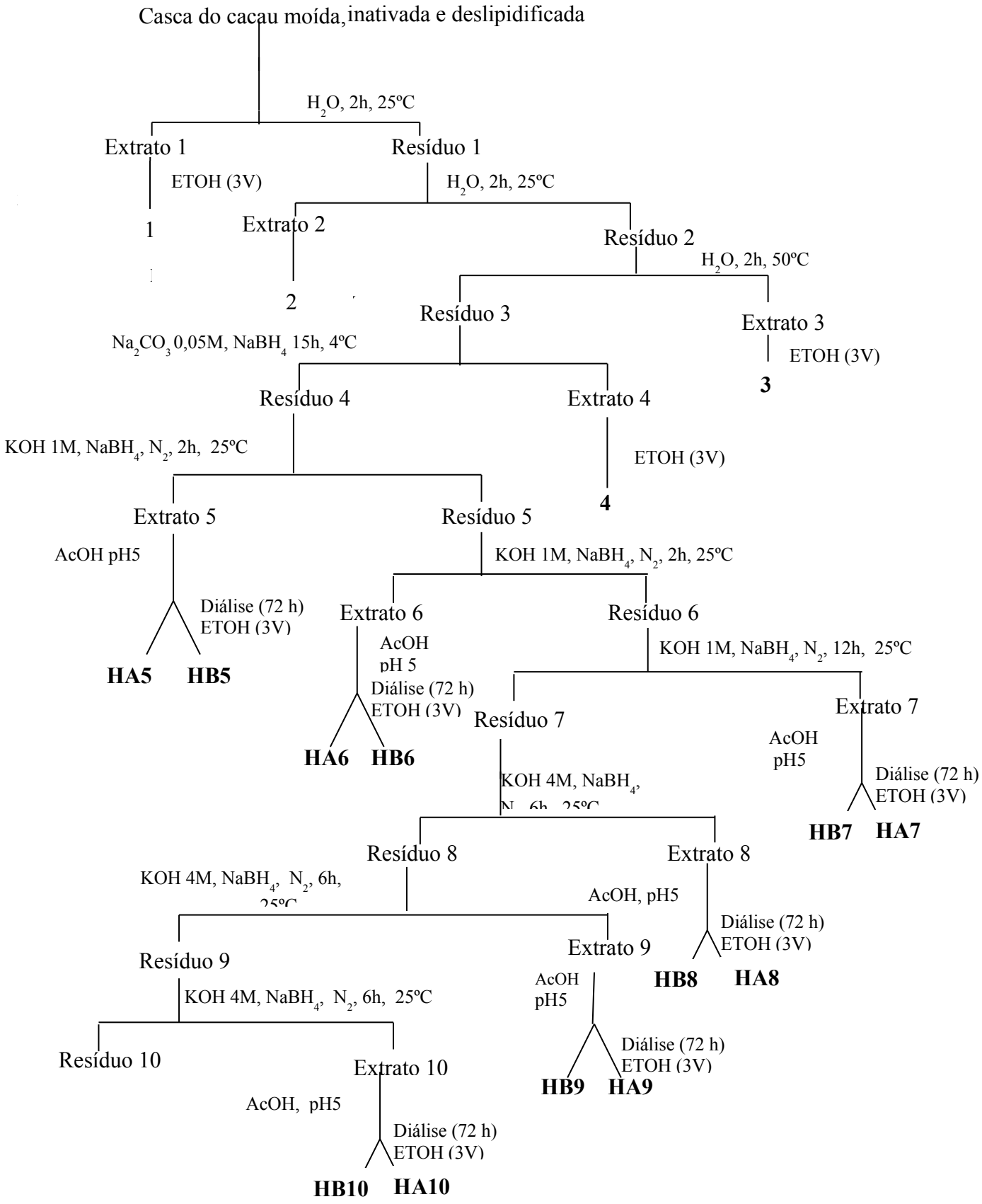


TABELA 3 - RENDIMENTO E TEOR DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA CASCA DO FRUTO DE *Theobroma cacao*

Fração	Rendimento[a] (%)	Açúcar total[b] (%)	Proteina [c] (%)	Proteina [d] (%)
1	7,0	43,6	17,4	17,5
2	2,1	43,5	17,3	11,4
3	1,4	55,1	46,0	44,8
4	2,0	35,0	39,5	37,1
HA-5	1,4	13,1	85,0	80,6
HB-5	1,0	33,0	66,0	36,7
HA-6	1,4	18,9	76,7	33,4
HB-6	0,9	45,0	50,0	17,4
HA-7	0,6	42,0	38,8	20,2
HB-7	0,7	30,8	64,2	20,3
HA-8	0,3	86,0	14,7	16,4
HB-8	2,7	74,3	25,7	9,9
HA-9	0,2	62,8	15,4	9,7
HB-9	1,2	83,1	27,0	16,4
HA-10	0,1	74,1	19,1	10,1
HB-10	0,3	69,0	28,5	11,4

(a): em relação à casca deslipidificadas;
(b): Método de DUBOIS et al. (1956);
(c): Método de HARTREE (1972);
(d): Método de PETERSON (1977).

As extrações aquosas apresentaram um rendimento total de 10,5%, sendo que o maior rendimento foi obtido na primeira extração (7%). Estes valores são semelhantes aos descritos por FIGUEIRA et al. (1994), que extraíram polissacarídeos solúveis em água com rendimento de 9,1% em relação à casca seca. Entre as frações alcalinas, a fração HB-8 foi a de maior rendimento, além de apresentar uma alto teor de carboidratos.

A composição monossacarídica das frações obtidas está indicada na Tabela 4. As frações obtidas por extrações aquosas apresentam altos percentuais de ácido urônico e galactose, além de pequenas proporções de ramnose e arabinose, indicando a presença de

polissacarídeos pécticos. Segundo ADOMAKO (1972), a casca dos frutos maduros de cacau contém 8-11% de pectinas.

A análise da composição monossacarídicas das frações correspondentes as hemiceluloses mostra a presença de glucose, xilose, galactose e fucose, sugerindo a ocorrência de xiloglucanas em diferentes frações. A fração de hemicelulose B, obtida na primeira extração com KOH 4M (HB-8) apresentou maior proporção de Glc, Xyl, Gal e Fuc, além de ser a fração hemicelulósica de maior rendimento. Esta fração foi escolhida para isolamento da xiloglucana estrutural. A presença de manose e arabinose, nesta fração sugere a presença de outros polissacarídeos, além da xiloglucana. As xiloglucanas fucosiladas presentes na parede celular estão firmemente ligadas à celulose, podendo ser obtidas quando solubilizadas com álcali concentrado sob agitação. Estas estão presentes nas frações de hemicelulose B, conforme já demonstrado anteriormente (SIDDIQUI; WOOD, 1977; SAKURAI; NEVINS, 1993; BUSATO et al., 2001).

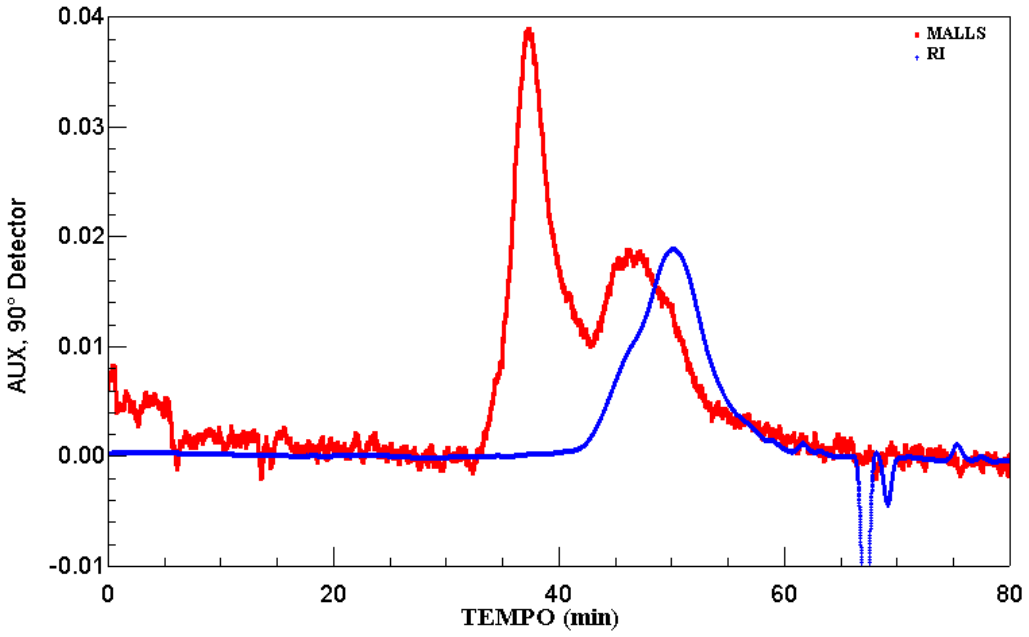
A fração HB-8 foi submetida a análise por HPSEC-MALLS/RI. O perfil de eluição obtido, mostrado na Figura 17, indica uma amostra heterogênea.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA CASCA DE *Theobroma cacao*.

	Composição monossacarídica [a]							
	Mol (%)							
Fração	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA[b]
1	4,9	0,2	3,1	0,2	0,7	45,8	3,4	41,7
2	4,3	-	3,9	-	1,4	44,3	3,6	42,4
3	6,1	-	6,9	-	4,6	38,3	5,7	38,4
4	7,4	4,6	9,1	4,2	2,0	26,3	4,3	42,0
HA-5	-	-	38,1	34,0	6,7	14,4	5,5	1,3
HB-5	-	1,2	55,4	21,9	2,2	10,1	2,5	6,6
H-6	1,3	-	50,0	33,4	2,9	6,9	2,8	2,6
HB-6	1,8	0,9	35,9	31,1	5,0	14,0	5,9	5,4
HA-7	0,9	0,6	23,9	57,8	1,7	5,9	1,2	7,9
HB-7	-	1,2	37	18,0	10,0	18,4	13,7	1,6
HA-8	0,3	0,2	8,4	77,0	0,8	1,8	1,1	10,4
HB-8	-	3,5	11,5	21,3	17,2	19,3	26,0	1,0
HA-9	2,2	1,2	13,1	51,6	2,4	10,3	5,6	13,5
HB-9	-	2,9	27,2	20,6	10,1	14,9	17,3	7,0
HA-10	1,4	1,1	12,1	54,2	2,5	7,7	4,9	16,0
HB-10	-	2,8	22,8	28,2	5,3	14,1	12,0	14,8

(a): Açúcares neutros analisados por GLC ou GC-MS, na forma de acetatos de alditóis.
(b) método colorimétrico Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973).

FIGURA 17 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO HB-8 OBTIDA DA CASCA DOS FRUTOS DE *Theobroma cacao*

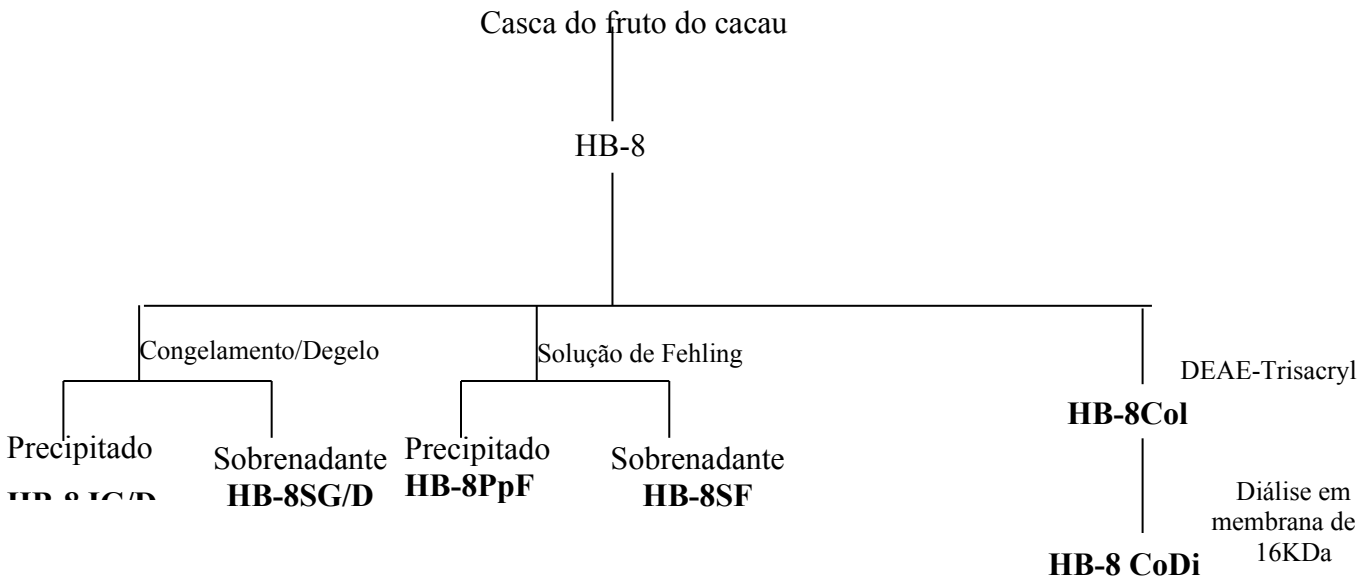


NOTA: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI da fração HB-8 (RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo 90º indicado em vermelho)

REDGWELL et al. (2003) ao isolarem os polissacarídeos da casca da semente do cacau concluíram que a porção hemicelulósica é uma mistura de xiloglucana fucosilada, galactoglucomanana e glucuronoarabinoxilana. E, embora os autores tenham utilizado métodos de precipitação fracionada, cromatografia de gel permeação e troca-iônica, não tiveram sucesso na purificação da xiloglucana.

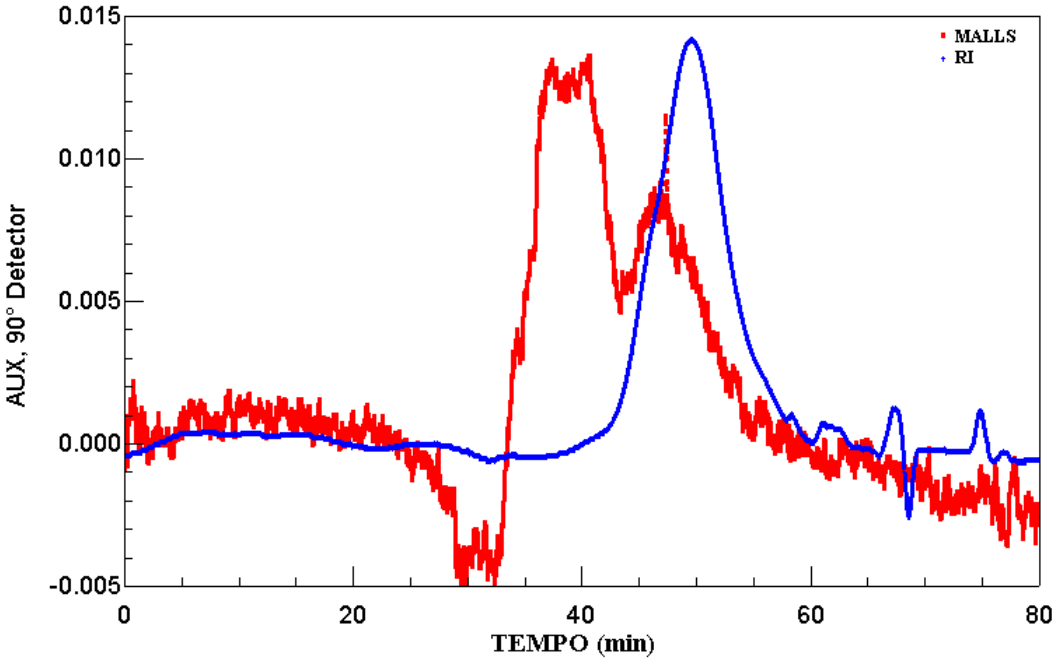
Na tentativa de purificar a xiloglucana da casca do fruto de cacau, a fração HB-8 foi submetida a diferentes processos de fracionamento, conforme demonstrado na Figura 18.

FIGURA 18 - FLUXOGRAMA DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO HB-8



Quando a fração HB-8 foi submetida ao processo de congelamento/degelo houve a formação de duas frações: uma solúvel após degelo (HB-8SG/D) e outra insolúvel após degelo (HB-8IG/D). A fração HB-8SG/D foi analisada por HPSEC-MALLS/RI (Figura 19)

FIGURA 19 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO HB-8SG/D



NOTA: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI da fração HB-8 após processo de purificação por congelamento/degelo (HB-8SG/D) (RI-detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo 90º indicado em vermelho.)

A composição monossacarídica das frações resultantes do processo de congelamento/degelo foi bastante semelhante entre si (Tabela 5), e não correspondem ao esperado para uma xiloglucana fucosilada de estrutura convencional. Apesar da composição semelhante, estes polissacarídeos provavelmente apresentam massas moleculares distintas o que justifica as diferenças na solubilidade.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA HB-8

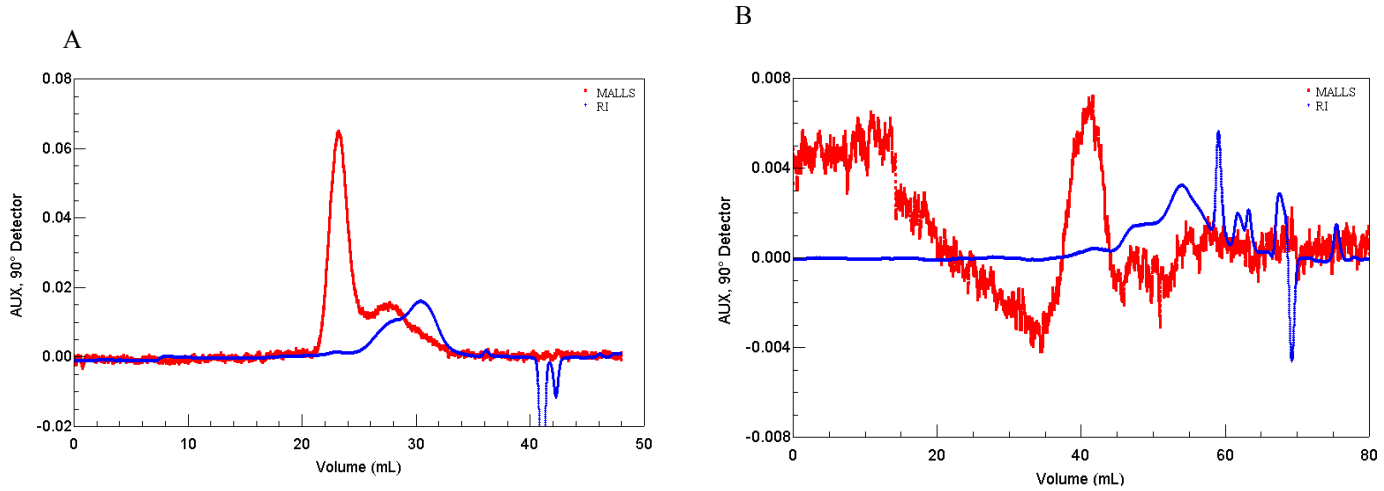
	Composição monossacarídica [a]					
	mol (%)					
Fração	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
HB-8SG/D	4,4	15,1	27,9	19,4	15,4	18,0
HB-8IG/D	4,2	13,0	22,5	17,8	22,3	20,1
HB-8Col	4,1	6,3	13,3	20,5	17,7	38,0
HB-8PpF	4,8	6,3	23,5	10,1	21,7	33,6
HB-8SF	1,8	45,1	21,4	7,8	12,4	11,5

(a): Açúcares neutros analisados por GLC e GC-MS, na forma de acetatos de alditóis.

A fração HB-8 foi tratada com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Este procedimento forneceu duas frações, a fração precipitada com o reativo de Fehling (HB-8PpF) e o sobrenadante (HB-8SF). Os perfis de eluição destas frações por HPSEC-MALLS/RI (Figura 20) e a composição monossacarídica (Tabela 5) indicam que o método não foi eficiente no fracionamento dos polissacarídeos presentes na fração HB-8.

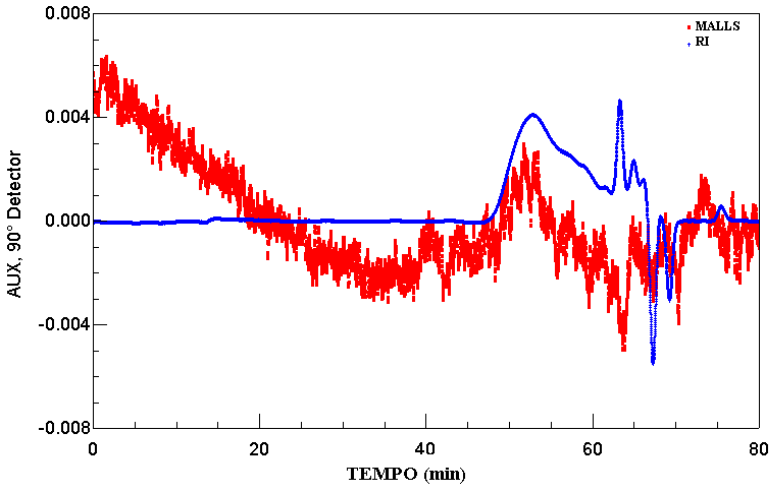
Para remoção de proteína, pigmentos e polissacarídeos ácidos que está presentes na amostra, a fração HB-8 foi submetida a cromatografia de troca iônica em DEAE-Trisacryl Plus M. A fração obtida por eluição com água foi denominada HB-8Col. Embora o método tenha sido eficiente na remoção de pigmentos a amostra resultante não se apresentou homogênea (Figura 21) e apresenta ainda alto conteúdo de manose (Tabela 5).

FIGURA 20 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES HB-8PpF e HB-8SF



NOTA: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI da fração HB-8 após tratamento com solução de Fehling. (A) Precipitado (HB-8PpF), (B) Sobrenadante (HB-8SF) (RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo 90º indicado em vermelho).

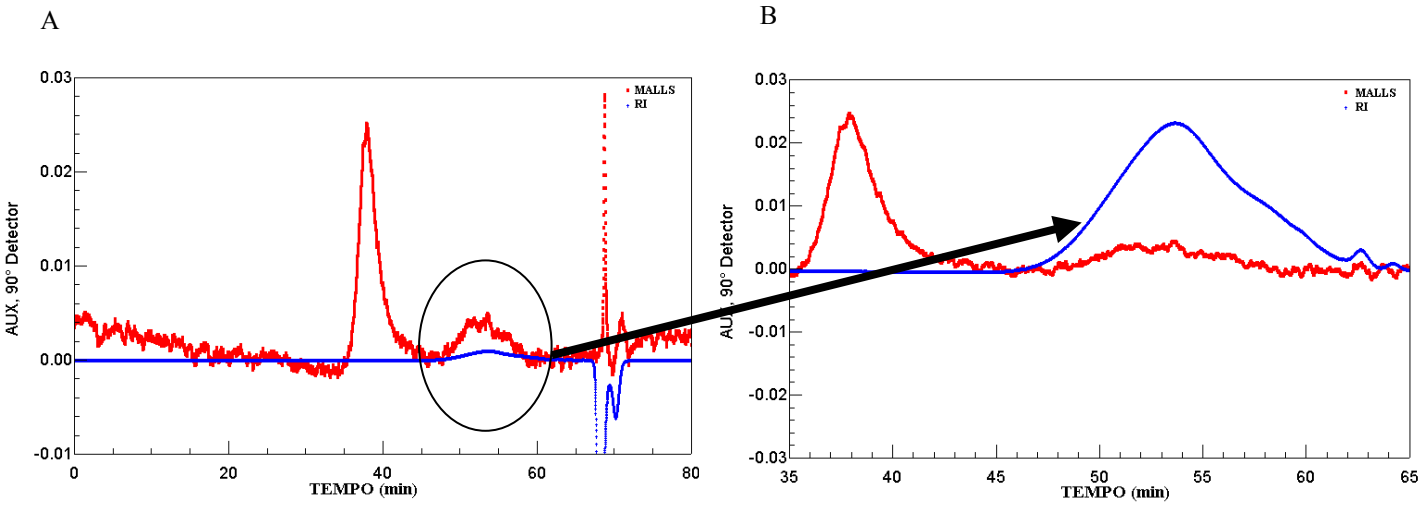
FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO HB-8Col



NOTA: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI da fração HB-8 após cromatografia de troca iônica em DEAE-Trisacryl Plus M (RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo 90º indicado em vermelho).

Devido à presença de componentes de baixa massa no perfil de HPSEC-MALLS/RI, a fração HB-Col foi dialisada em membrana com limite de exclusão de 16KDa. O perfil de homogeneidade desta fração obtida após diálise (HB-8CoDi) está demonstrado na Figura 22. A ampliação do pico em torno de 55 min permite observar que a fração obtida não é homogênea.

FIGURA 22 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO HB-8CoDi



NOTA: Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI da fração HB-8 após cromatografia de troca iônica (DEAE-Trisacryl) seguido de diálise fechada em membrana de 16KDa (HB-8CoDi); (B) Detalhe ampliado da região 45-65 min do perfil de eluição da fração HB-8CoDi. (RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS-detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo 90º indicado em vermelho).

A purificação e os testes biológicos relacionados à xiloglucana estrutural da casca de cacau serão realizados em estudos futuros e comparados com os efeitos obtidos pelas xiloglucanas de reserva, os quais estão descritos e apresentados abaixo.

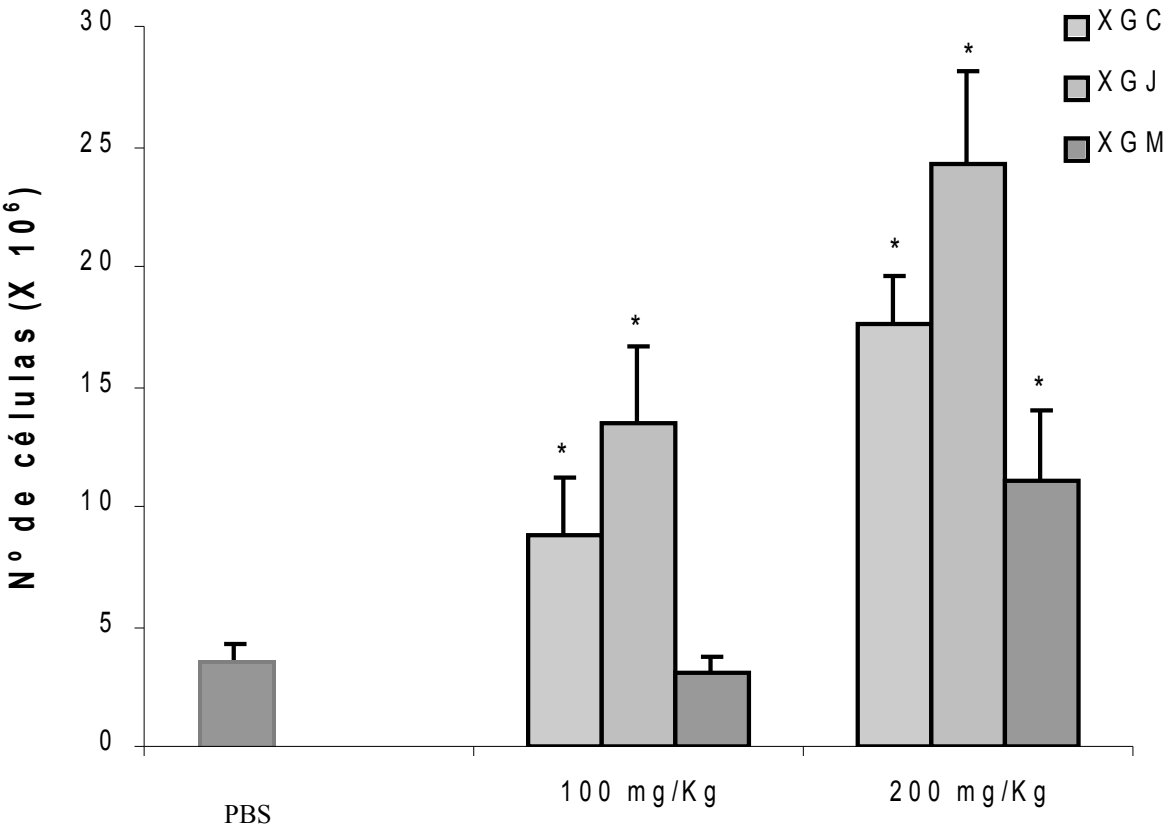
4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS XILOGLUCANAS DE COPAÍBA, JATOBÁ E MUCUNA SOBRE MACRÓFAGOS

Nenhum estudo foi encontrado na literatura em relação à atividade imunomoduladora de xiloglucanas de *Copaifera langsdorffi*, *Hymenaea courbaril* e *Mucuna sloanei*. As frações homogêneas XGC1, XGJ1 e XGM1, obtidas das sementes de *Copaifera langsdorffi*, *Hymenaea courbaril* e *Mucuna sloanei*, respectivamente, foram avaliadas quanto à capacidade de atuarem como modificadores da resposta biológica (BRM) utilizando como modelo macrófagos peritoneais de camundongos. Nos ensaios biológicos, estas frações foram denominadas XGC, XGJ e XGM.

Para avaliar se as xiloglucanas XGC, XGJ e XGM promovem ativação *in vivo* foram realizados experimentos de atividade elicitora, nos quais os polissacarídeos nas concentrações de 100 ou 200 mg/Kg foram inoculados intraperitonealmente em grupos de quatro camundongos para cada amostra. Após 24 horas da inoculação, as células foram coletadas da cavidade intraperitoneal e contadas. Como grupo controle foi utilizado células da cavidade intraperitoneal de camunudongos tratados com PBS estéril.

A Figura 23 mostra o aumento do número de células recrutadas para cavidade peritoneal após 24 horas a inoculação das xiloglucanas, nas quais se pode observar uma resposta dose-dependente. A percentagem de células recrutadas nos grupos tratados com a amostra XGC foi cerca de 146% e 388% na concentração de 100 e 200 mg/Kg, respectivamente, quando comparada com o grupo controle. O polissacarídeo XGJ promoveu aumento semelhante ao XGC, mostrando ser mais intenso para a concentração de 200 mg/Kg, onde alcançou cerca de 576% em relação ao controle. Já para a xiloglucana XGM, o aumento do número de células foi inferior aqueles observados para XGC e XGJ, sendo que na concentração de 100 mg/Kg não mostrou ser capaz de recrutar macrófagos para a cavidade peritoneal, enquanto que na concentração 200 mg/Kg o aumento foi de aproximadamente 207 %, quando comparada com o controle.

FIGURA 23 – ATIVIDADE ELICITORA DE CÉLULAS PARA CAVIDADE PERITONEAL REALIZADA PELAS XILOGLUCANAS XGC, XGJ E XGM



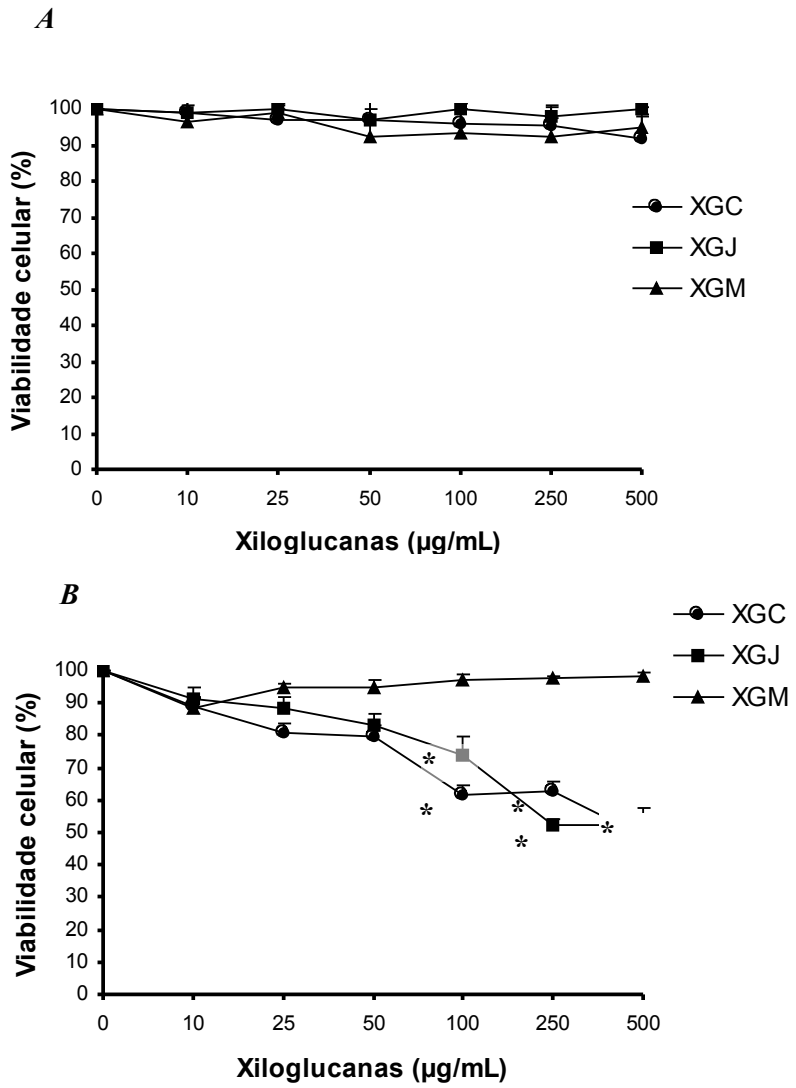
NOTA: Foram inoculados intraperitonealmente as xiloglucanas XGC, XGJ e XGM estéreis nas concentrações indicadas em camundongos albinos Swiss (n=4 para cada grupo). Os animais do grupo controle foram tratados com PBS estéril. Após 24 horas as células do exsudato peritoneal foram coletadas de cada grupo e contadas em câmara de Neubaur. Os resultados estão expressos como média ± DP * Diferença significativa do controle; $p \leq 0,05$.

A intensidade no aumento na capacidade elicitora de macrófagos observada para as xiloglucanas avaliadas neste trabalho foi superior ao já descrito para outros polissacarídeos. A α-D-glucana (1→3) (1→4) isolada do líquen *Ramalina celastri* nas concentrações de 200 mg/Kg promoveu um aumento (130%) das células recrutadas para a cavidade peritoneal de camundongo, após sete dias de inoculação (STUELP-CAMPELO et al., 2002). A administração intraperitoneal de um heteropolissacarídeo ácido (arabinogalactana), constituído principalmente por galactose e arabinose, isolado da goma da árvore *Anadenanthera colubrina*, levou a um aumento da capacidade elicitora quando comparadas ao controle de aproximadamente 18, 44 e 88 % nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/mL, respectivamente, após 24 horas da inoculação (MORETÃO et al 2004).

Após observar que os polissacarídeos foram capazes de recrutar macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos, evidenciando, portanto, possível efeito como moduladores da resposta biológica, experimentos foram direcionados para avaliar os efeitos biológicos das xiloglucanas sobre macrófagos *in vitro*. Para isso, fez-se necessário estabelecer as concentrações ideais para incubação destes polímeros com as células a fim de evitar o uso de doses excessivas que poderiam causar danos à viabilidade celular, tanto em períodos curtos (2 horas) como em períodos prolongados (48 horas) de incubação. A Figura 24 mostra o resultados obtidos utilizando os polissacarídeos XGC, XGJ e XGM nas concentrações de 10 a 500 µg/mL utilizando o teste do MTT.

Pode-se observar na Figura 24a que em todas as concentrações testadas as xiloglucanas XGC, XGJ e XGM não exibem efeitos na viabilidade de macrófagos quando incubados por 2 horas. Porém, em incubação de 48 horas (Figura 24b) os polissacarídeos XGC e XGJ mostram-se citotóxicos para as células a partir da concentração 100µg/mL, diminuindo a viabilidade celular em torno de 40% e 30%, respectivamente. Já o polímero XGM não mostrou ser citotóxico nas concentrações e condições testadas.

FIGURA 24 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS XGC, XGJ E XGM SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS



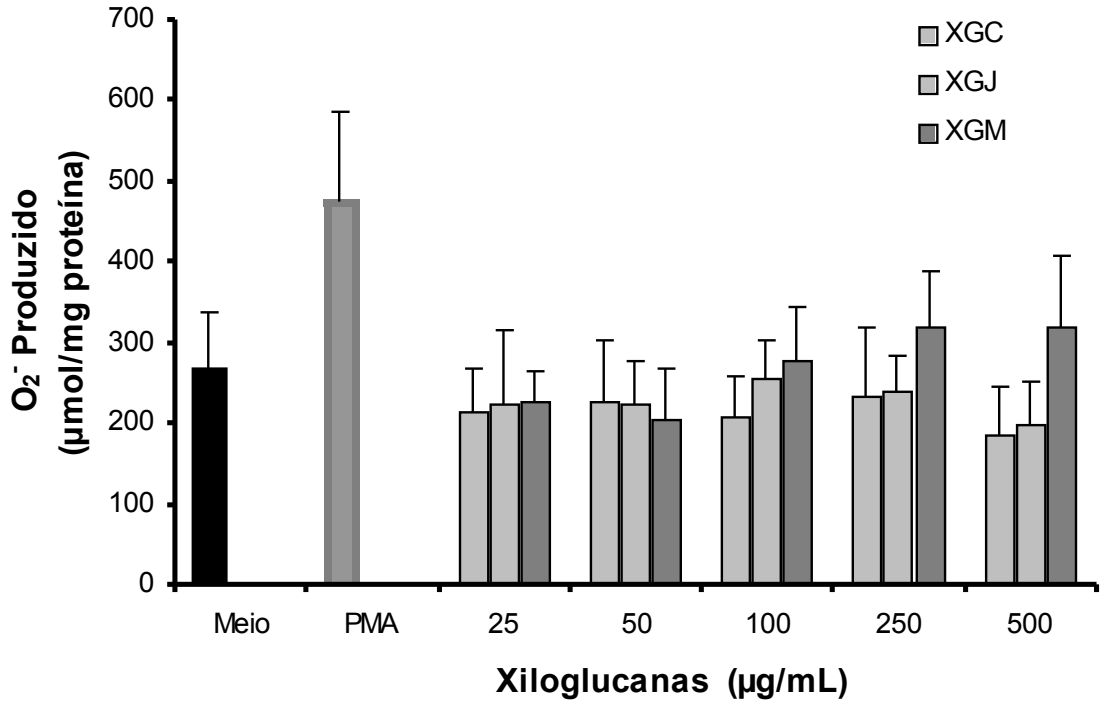
NOTA: Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. Macrófagos aderentes foram incubados por 2 horas na presença das xiloglucanas XGC, XGJ e XGM nas concentrações indicadas. Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 9) de três experimentos independentes em triplicata. **B** - Macrófagos aderentes foram incubados por 48 horas na presença das xiloglucanas XGC, XGJ e XGM nas concentrações indicadas. Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 12) de três experimentos independentes em quadruplicata. Após a incubação o MTT foi removido e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. 100 % de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para as células incubadas em meio MEM. * Diferença significativa do controle; $p \leq 0,05$.

A interferência dos polissacarídeos XGC, XGJ e XGM na produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) resultante da ativação de um complexo enzimático NADPH oxidase também foi avaliada por duas condições experimentais: na ausência de PMA e na presença de PMA, sendo este um agente conhecido por seu efeito estimulador desta via (JUN et al., 1993; HALLIWELL; GUTTERDGE, 1999). Neste trabalho, a produção de $O_2^{\bullet-}$ foi quantificada através da redução extracelular do citocromo c (SASADA et al., 1983).

Os efeitos da XGC, XGJ e XGM sobre a produção de ânion superóxido na ausência de PMA estão demonstrados na Figura 25. Apesar de ser observado uma discreta tendência de aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$com o aumento na concentração das xiloglucanas (XGC, XGJ e XGM), esta não foi estatisticamente significativa. Diferentemente do que foi descrito para a xiloglucana de sementes de *Tamarindus indica*, onde a mesma ativou esta via (PAULY; FREIS; PAULY, 1999). Entretanto, é importante salientar que o experimento realizado por PAULY; FREIS; PAULY (1999), utilizou a quimioluminescência, uma técnica mais sensível do que aquela utilizada no presente trabalho.

O efeito dos polissacarídeos XGC, XGJ e XGM foi diferente quando comparado com a zimosana, uma mistura de manana e glucana a qual é utilizada como indutor da produção de $O_2^{\bullet-}$em células fagocíticas (BADWAY; KARNOVSKI, 1980; KARNOVSKI; BADWAY, 1986; BERTON; GORDON, 1983; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em condição experimental similar a arabinogalactana isolada da planta *Phyllanthus niruri* também mostrou-se ser capaz de induzir a produção de $O_2^{\bullet-}$ sendo este efeito observado por uma magnitude três vezes superior (na concentração de 250 µg/mL) quando comparado ao controle (MELLINGER et al., 2005). Outra arabinogalactana isolada da goma de *Anadenanthera colubrina*, onde o polissacarídeo foi inoculado na cavidade peritoneal do camundongo mostrou-se capaz de ativar o “burst” respiratório na presença e na ausência de PMA (MORETÃO et al, 2003).

FIGURA 25 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS XGC, XGJ e XGM SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS



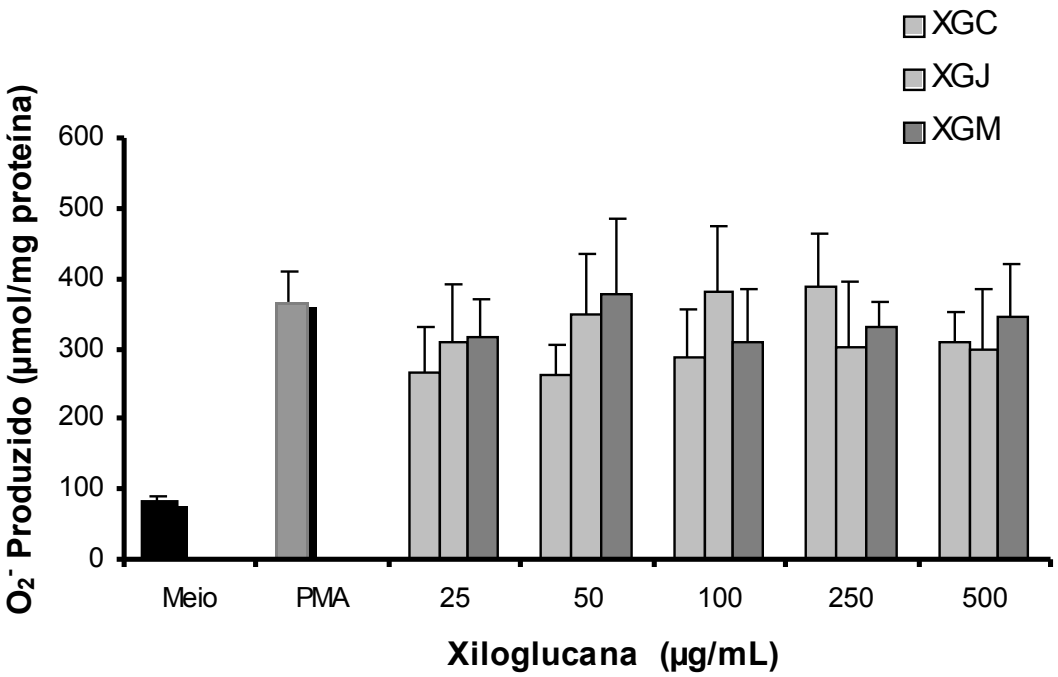
NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados em meio de reação padrão constituído por HBSS contendo ferricitocromo c (80 µmol/L) mais os polissacarídeos XGC, XGJ e XGM nas concentrações acima. Como controle as células foram incubadas somente com o meio de reação e para o controle positivo desta via as células foram incubadas com o meio na presença de PMA (1 µg/mL). Após o tempo de 2 horas a absorbância do sobrenadante foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, o qual corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada através do coeficiente de extinção molar ($C_{oxid.red.}\Delta\varepsilon=2,1x10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$): $C=A/\varepsilon$ (JOHNSTON *et al.*, 1978). Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP (n = 8) de dois experimentos independentes quadruplicata. * Diferença significativa do controle; $p \leq 0,05$.

De acordo com os resultados descritos, pode-se sugerir que a estrutura pode ser crucial para determinado polissacarídeo estimular o macrófago a produzir $O_2^{\bullet-}$. Com a finalidade de avaliar se os polissacarídeos em estudo interferem nesta via previamente estimulada por éster de forbol, foram realizados experimentos onde os polissacarídeos foram adicionados aos macrófagos na presença deste agente.

Os resultados estão indicados na Figura 26, onde se observa que a presença dos polissacarídeos não interferiu de forma significativa no efeito induzido pelo PMA, ou seja, não mostraram exercer efeitos aditivos ou sinérgicos e nem inibiram a produção de ânion superóxido induzida pelo PMA. Efeitos contrários foram observados para outros polissacarídeos neutros, manana e galactomanana, para os quais os autores sugeriram a possibilidade de uma atividade antioxidante (seqüestradora de radicais) exercido pelos polissacarídeos quando adicionados na presença de PMA (NOLETO et al., 2002; 2004). TSIAPALI et al. (2001) relataram efeitos antioxidantes em diversos polissacarídeos como: pululana, manana, dextrana e glucana-fosfato e constataram que estes apresentam atividade antioxidante maior do que suas unidades monossacarídicas, isto é devido a maior facilidade de retirada de próton do carbono anomérico do polímero do que das unidades monossacarídicas livres.

Outro aspecto avaliado foi a possibilidade dos polissacarídeos XGC, XGJ e XGM de induzir a produção de óxido nítrico. Este metabólito atua como parte da resposta inflamatória sendo capaz de inibir o crescimento de diversos agentes de doenças infecciosas como, por exemplo, bactérias, fungos, protozoários e parasitas helmínticos. Quando produzido por macrófagos, o óxido nítrico desenvolve um papel importante em processos patológicos, como a defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (WOODS et al., 1994; MAcMICKING et al., 1997).

FIGURA 26 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS XGC, XGJ e XGM SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE PMA



NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados em meio de reação constituído por HBSS contendo ferricitocromo c (80 µmol/L) na presença de PMA (1 µg/mL) mais os polissacarídeos XGC, XGJ e XGM nas concentrações acima. Como controle as células foram incubadas somente com o meio de reação e com PMA (1 µg/mL). Após o tempo de 2 horas a absorbância do sobrenadante foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, o qual corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada através do coeficiente de extinção molar ($C_{oxid.red.}\Delta\varepsilon = 2{,}1 \times 10^4\ M^{-1}\ cm^1$): $C = A/\varepsilon$ (JOHNSTON *et al.*, 1978). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 9) de dois experimentos independentes em quadruplicata. Os resultados estão expressos como média ± DP * Diferença significativa do controle; $p \leq 0{,}05$.

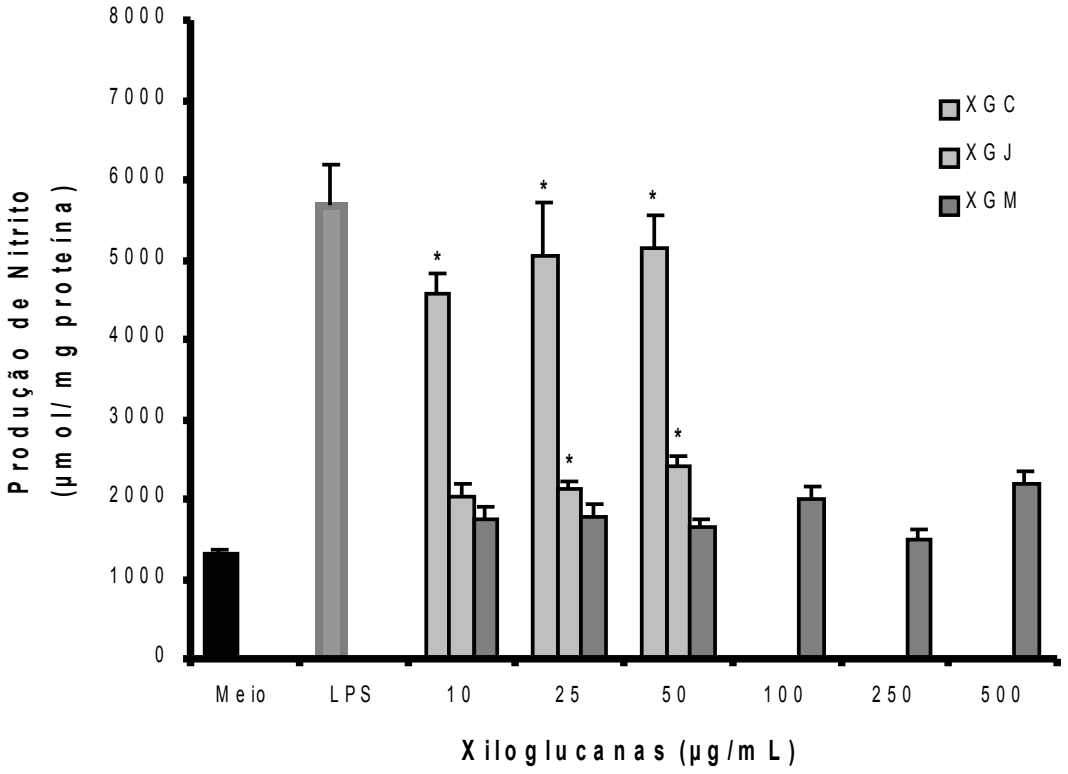
No presente estudo, a produção de $NO^{\bullet}$ foi avaliada em experimentos de 48 horas de incubação, onde o LPS foi utilizado como controle positivo, o qual é reconhecido como uma molécula co-sinal na indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CUNHA et al., 1993).

Na Figura 27 pode-se observar que os polissacarídeos XGC, XGJ e XGM promoveram um aumento na produção de óxido nítrico. Para as xiloglucanas XGC e XGJ foram utilizadas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL e para XGM, concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL pré-determinadas de acordo com os efeitos na viabilidade celular de macrófagos em 48 horas.

Observa-se que as três xiloglucanas avaliadas mostraram intensidade de efeitos diferentes sobre a produção de óxido nítrico. A XGC já na menor concentração (10 µg/mL) promoveu um aumento de aproximadamente 262% quando comparada com os macrófagos não tratados (meio). Este efeito mostrou ser dose-dependente chegando a aproximadamente 307% na maior concentração (50 µg/mL). A XGJ também induziu a produção de óxido nítrico, porém em menor intensidade quando comparado com a XGC, a partir da concentração de 25 µg/mL foi estatisticamente significativa com um estímulo de aproximadamente 92 % na maior concentração (50 µg/mL). Diferentemente do que foi observado para as xiloglucanas XGC e XGJ, a amostra XGM não mostrou um aumento significativo na produção de óxido nítrico.

Uma resposta semelhante, porém em menor intensidade ocorreu com a galactomanana do líquen *Ramalina celastri*, a qual na ausência de LPS e IFN-γ, aumentou a produção de $NO^{\bullet}$ em aproximadamente 40% quando comparadas com as células não tratadas (NOLETO et al.; 2002). RAMAMOORTHY et al. (1996) observaram que uma manana acetilada (Acemanana) na presença de IFN-γ também aumentou a produção de $NO^{\bullet}$. Os resultados destes autores sugerem que esta manana tem efeito sinérgico com o IFN-γ e ativa a transcrição do gene da iNOS (RAMAMOORTHY et al.; 1996).

FIGURA 27 – EFEITO DAS XILOGLUCANAS XGC, XGJ E XGM SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS



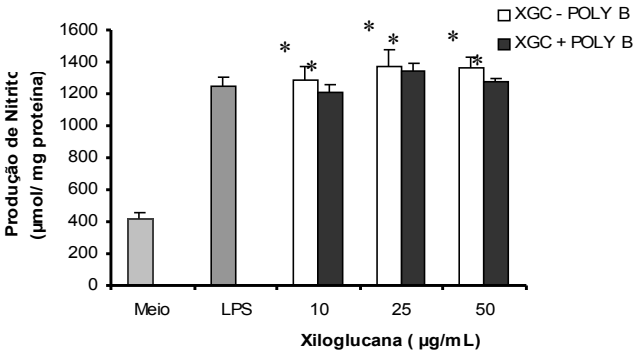
NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados por 48 horas, em meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, antibióticos e os polissacarídeos nas concentrações estipuladas. Utilizou-se como controle negativo o meio MEM e como controle positivo o LPS (50ng/mL). O NO produzido foi quantificado no sobrenadante como nitrito pelo método de Griess. A absorbância foi medida em 550 nm.
Os resultados estão expressos como média $\pm$ EP (n =15) de três experimento independentes em quadriplicata e um em triplicata. * Diferença significativa do controle; $p \leq 0,05$.

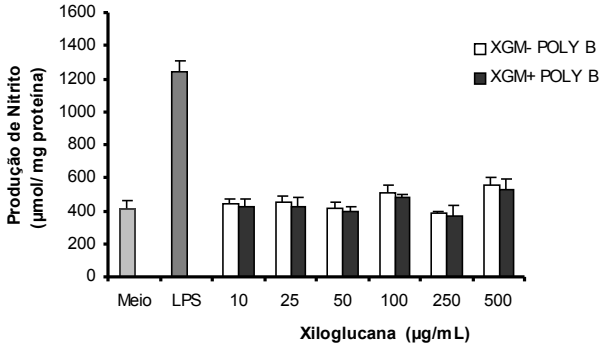
Para excluir a possibilidade de eventual contaminação das xiloglucanas XGC, XGJ e XGM por LPS (pré-contaminação bacteriana), o que levaria um aumento na produção de $NO^{\bullet}$, experimentos controle foram desenvolvidos na presença de polimixina B, um antibiótico reconhecido por seu efeito neutralizante do LPS, por se ligar à porção lipídica desta molécula (STORN, 1977; LASFARGUES, 1986). A Figura 28 mostrou que na presença de polimixina B não houve alteração na produção de óxido nítrico para as amostras XGC e XGM, porém com a amostra XGJ observou-se uma diminuição significativa na produção deste radical nas concentrações de 25 e 50 µg/mL de XGJ. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que o efeito da polimixina seja resultante também da sua interação XGJ, anulando o seu efeito na produção de $NO^{\bullet}$ (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

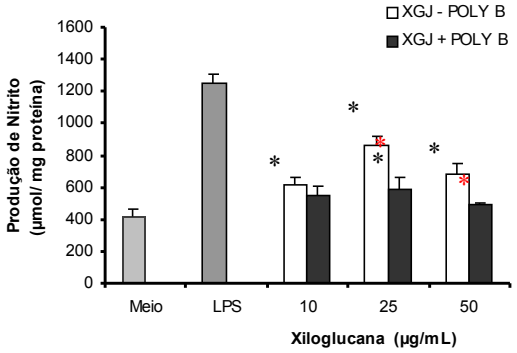
De acordo com os resultados mostrados neste trabalho pode-se sugerir que as xiloglucanas isoladas dos cotilédones *Copaifera langsdorffi* (XGC) e *Hymenaea courbaril* (XGJ) exibiram propriedades moduladoras das funções de macrófagos através da capacidade de estimular a via de produção de $NO^{\bullet}$ *in vitro* e a elevada capacidade de recrutar macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos *in vivo*. Não foi observado um efeito significativo *in vitro* para a xiloglucana isolada de *Mucuna sloanei* (XGM) como para as outras xiloglucanas para a produção de óxido nítrico e de ânion superóxido. Porém, *in vivo*, este polissacarídeo foi capaz de aumentar a capacidade elicitora de células para a cavidade peritoneal de camundongos na concentração de 200 mg/Kg.

Embora os polissacarídeos testados tenham uma composição química semelhante, diferenças na massa molar e estrutura fina das mesmas podem ser responsáveis pelas respostas distintas observadas nos experimentos biológicos. A análise dos oligossacarídeos obtidos por tratamento enzimático das xiloglucanas provenientes das sementes de copaíba indica principalmente a presença de XXXG, XLXG, XXLG e XLLG na proporção de 1,0: 1,1: 1,8: 7,4 e 1,0: 1,3: 2,6: 12 para sementes provenientes da savana e da floresta, respectivamente (BUCKERIDGE et

FIGURA 28 - EFEITO DA XGC, XGJ E XGM SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE POLIMIXINA B







NOTA: Macrófagos aderentes foram incubados por 48 horas, em meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, com antibióticos e os polissacarídeos nas concentrações estipuladas em presença e ausência de polimixina B. Utilizou-se como controle negativo o meio MEM e como controle positivo o LPS. O NO produzido foi quantificado no sobrenadante como nitrito pelo método de Griess. A absorbância foi medida em 550 nm.

Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 6) de dois experimento independentes em triplicata. * Diferença significativa do controle; $p \leq 0,05$. * Diferença significativa na produção de ânion superóxido na amostra quando comparada com presença de polimixina.

al., 1992). Entretanto, para o jatobá, além das estruturas acima mencionadas foi identificado uma série nova de oligossacarídeo XXXXG, o qual perfaz aproximadamente 50% da composição total da estrutura (BUCKERIDGE et al., 1997; FREITAS et al., 2005).

Já, a análise dos oligossacarídeos da xiloglucana da semente de mucuna mostrou uma composição semelhante a obtida para copaíba, porém em proporções bastante distintas, sendo de 4,7: 1,0: 14,6: 31,8 para os oligossacarídeos XXXG, XLXG, XXLG e XLLG (TEIXEIRA, 2005).

A diferença na estrutura fina destes polissacarídeos pode resultar em diferentes conformações, as quais resultam em diferentes respostas, uma vez que a atividade biológica é, em grande, parte determinada pela estrutura tridimensional das partes envolvidas na interação.

5. CONCLUSÃO

- A partir dos cotilédones de *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* e *Mucuna sloanei* foram isoladas xiloglucanas de reserva (XGC, XGJ e XGM) com perfil homogêneo por HPSEC-MALLS/RI

- A composição monossacarídica das frações obtidas por extrações alcalinas da casca do fruto de *Theobroma cacao* sugerem a presença de xiloglucanas estruturais. O tratamento da fração hemicelulósica de maior rendimento e maior proporção de Glc: Xyl: Gal: Fuc, por congelamento/degelo, precipitação com reativo de Fehling, cromatografia de troca iônica e diálise não forneceu uma xiloglucana fucosilada pura.

- As xiloglucanas homogêneas, XGC, XGJ e XGM foram testadas quanto a atividade biológica. Estes polissacarídeos não afetaram a produção de ânion superóxido. Entretanto, as xiloglucanas obtidas das sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea courbaril* promoveram ativação *in vitro* de macrófagos peritoneais com aumento na produção de óxido nítrico. Diferentemente, a xiloglucana das sementes de *Mucuna sloanei* não mostrou-se capaz de ativar esta via. Todas as frações testadas mostraram-se capazes de ativar macrófagos *in vivo* devido ao aumento na atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal de camundongos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. Immunologia celular e molecular. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, p.23-26, 256-283, 2000.

ABEL, G.; CZOP, J.K. Stimulation of human monocytes β-glucan receptors by glucan particles induce production of TNF-α e IL-1β. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 14, p. 1363-1373, 1992.

ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Inhibitory effect of β-glucan on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.** V. 16, p. 462-467, 1993.

ADAMS, D.O. Macrophages. **Methods Enzymol**., v. 58, p. 494-506, 1979.

ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 269-276, 1965.

ADOMAKO, D. Cocoa pod husk pectin. **Phytochemistry**. v. 11, p. 1145-1148, 1972.

AJIWE, V.I.E.; OKEKE, C.A; NNABUIKE, B.; OGUNLEYE, G.A. ELEBO, E. Applications of Oils Extracted from African Star Apple (*Chrysophyllum africanum*), horse eye bean (*Mucuna sloanei*) and African pear (*Dacryodes edulis*) seeds. **Bioresource Thecnology**. v. 59, p. 259-261, 1997.

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.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry.** Academic Press, San Diego, 1997, p.143-204.

BABIOR, M.B. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** v. 65, p. 49-95, 1992.

BADWEY, J.A.; KARNOVSKI, M.L. Active oxygen species and the functions of phagocitic leuckocytes. **Annu. Rev. Biochem.** v. 49, p. 695-726, 1980.

BAUER, W.D.; TALMADGE, K.W.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiol.**, v. 51, p.174-187, 1973.

BERTON, G.; GORDON, S. Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. **Immunology**. v. 49, p. 705-715, 1983.

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.

BILLIAR, T.R.; HOFMAN, R.A.; CURRAN, R.D.; LANGEHR, J.M.; SIMMONS, R.L. A role of inducible nitric oxide biosynthesis in liver in inflammation and in the allogenic immune response. **J. of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 120, p. 192-197, 1992.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, v. 54, p. 484-489, 1973.

BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. Are hemicelluloses from *Podocarpus lambetii* typical of gymnosperms?**Carbohydrate Polym**, v.53, p.127-136, 2003.

BOHN, J.A.; Be MILLER, J.N. 1→3 β-D-glucans as biological response modifiers:a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym**, England, v.28, p.3-14,1995.

BRADFORD, M. A rapid amd sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requirig enzyme. **Procceding of the National Academy of Sciences**. v. 87, p. 682-685, 1990.

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., 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 seeds1.**Rev. Brasil. Bot.** v. 13, p. 109-112, 1990.

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.

BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; GORIN, P.A.J.; PETKOWICZ, C.L.; TISCHER, C.A., BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. New 4-*O*-substituted xylosyl units in the xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. **Biol Macromolecules.** v.35, p.277-282, 2005.

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

CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; BUCHI, D.F; IACOMINI, M; GORIN, P.A.J.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharide from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Sub. Cytol. Pathol**. v. 24, p. 1-5, 1997.

CARPITA, N.; 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.

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.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p. 274-279.

CAVAILLON, J.M. Cytokines and macrophages. **Biomed. Pharmacother.** v. 48, p. 445-453, 1994.

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura cacaueira. <www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm> Acesso em: 20 out. 2005

COHEN, S. M.; RYAN, L.R.; ROOT, K.P. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect on monolayer formation. **J. of Immunology.** v. 127, p. 1007-1011, 1981.

COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. **J. Immunol.**, v. 121, p. 813-816, 1978.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins: Pathologic basis of disease**. 5 ed, W.B Saunders Company, p.11-13, 1994.

CRAWFORD, R.M.; FINBLOOM, D.S.; CHARA, J.; PAUL, W.E.; MELTZER, M.S. B-cell stimulatory factor-1 (IL-4) activated macrophages for increased tumoricidal activity and expression of la antigens. **J. Immunol.** v. 139, p. 135-141, 1987.
CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia University, p. 555, 1988.

CUNHA, F.Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Immunology.** v. 79, p. 408-411, 1993.

CUTILLAS-ITURRALDE, A.; PEÑA, M.J.; ZARRA, I.; LORENCES, E.P. A xyloglucan from persimmon fruit cell walls. **Phytochemistry**, London, v. 48, p. 607-610, 1998.

DEUK, H.M.; SOOK, L.E.; KWEON, K.Y.; WOO, L.J.; HOON, J.; HA, T.K. Production of nitric oxide in raw 264.7 macrophages teated with ganoderan, the beta-glucan of *Gonoderma lucidum*. **KOREAN J. Mycol.** v. 26, p. 246-255, 1998.

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. **Carbohydr. Polym.,** v. 53, p. 253-261, 2003.

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

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**. v. 130, p. 432, 1959.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BeMILLER, J.N.; New products from *Theobroma cacao*: Seed pulp and pod gum. **News crops**. v. 2, p.1-5, 1993.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BeMILLER, J.N.; Partial characterization of cacao pod and stem gums. **Carbohydr. Polym**. v. 24, p. 133-138, 1994.

FOSKET, D.E. Characteristics of plant cells that are important in development. In: **Plant Growth and Development. A molecular Approach**. Ed: Academic Press. San Diego, p.198-273, 1994.

FOUQUERAY, B.; PHILIPPE, C.; AMRANI, A.; PEREZ, J.; BAUD, L. Heat shock

prevents lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-α synthesis by rat mononuclear phagocytes. **Eur. J. Immunol.** v. 22, p. 2983-2987, 1992.

FREITAS, R.A., GORIN, P.A.J., NEVES, J., SIERAKOWSKI, M.-R.. A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydr. Polym.**, v. 51, p. 25-32, 2003.

FREITAS, R.A., MARTIN, S.; PAULA R.C.; FEITOSA, J.P.A.; SIERAKOWSKI, M.-R. Effects of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of na oxidized galactoxyloglucan frm *Hymenaea courbaril* (Jatobá) seeds. **Thermochimica acta.** v. 409, p. 41-47, 2004.

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. **Carbohydr. Polym. In press** 2005.

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

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.

GOLDMAN, R. Characteristics of the β-glucan receptor fo murine macrophages. **Exp. Cell Res.** v. 174, p. 481-490, 1988.

GRENN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochem.** v. 126, p. 131-138, 1982.

GREEN, J.S.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotas initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-γ-stimulated macrophages ny induction of tumor necrosis factor-γ. **J. Immunol.** v. 145, p. 4290-4297, 1990.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwel, B.; Gutteridge, J.M.C. (eds), **Free Readic. Biol. Med.**, p.544-616, 1999.

HANKS, J.H.; WALLACE, R.E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 71, p. 196, 1949.

HANTUS, S.; PAULY, M.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P.; YORK, W.S. Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans. **Carbohydr. Res.**, v. 304, p. 11-20, 1997.

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

HENSEL, A.; SCMIDGALL, J.; KREIS, W. The plant cell wall – A potential source for pharmacologically active polysaccharides. **Pharmaceutica acta helvetiae**. v. 73, p. 37-43, 1998.

HENSEL, A.; MEIER, K. Pectins and xyloglucans axhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. **Planta Medica.** v. 65, p. 395-399, 1999.

HOFFMAN, M.; JIA, Z.; PEÑA, M.J.; CASH, M.; HARPER, A.; BLACKBURN II, A.R.; DARVILL, A.; YORK, W.S. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell wall of plants in the subclass Asteridae. **Carbohydr. Res.** v. 340, p. 1826-1840, 2005.

JAMES, S.L.; Role of nitric oxide in parasitic infections, **Microbiol. Rev.** v. 59, p. 533-547, 1995.

JIA, Z.; Qin, Q.; DARVILL, A.G., YORK, W. Structure of xyloglucan produced by suspension-cultures tomato cells. **Carbohydr. Res**. v.338, p. 1197-1208, 2003.

JOHANSSON, A.; JESAITIS, A.J.; LUNDQVIST, H.; MAGNUSSON, K.E.; SJOLIN, C.; KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Different subcellular localization of cytochtome b and the dormant NADPH-oxidase in neutrophils and macrophages: effects on the production of reactive oxygen species during phagocytosis. **Cellular Immonology**. v. 161, p. 61-71, 1995.

JOHNSTON Jr., R.B.; GODZIK, C.A.; COHN, Z.A. Increase superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages.**J. Experimental Medicine.** v. 48, p. 115-127, 1978.

JONES, J.K.N.; STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.** v. 5, p. 36-38, 1965.

JUN, L.; MET, Z.; YUAN, C. Reversal of inhibition of reactive oxygen species on respiratory burst of macrophages by polysaccharide from *Coriolus versicolor*. **Intern. J. of Immunopharmacol.** v. 15, p. 429-433, 1993.

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

KARNOVSKY, M.L.; BADWAY, J.A. Respiratory burst during phagocytosis: an overview. **Met. Enzymol.** v. 132, p. 353-364, 1986.

KAWASAKI, N.; OHKURA, R.; MIYAZAKI, S.; UNO, Y.; SUGIMOTO, S.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 181, n. 2, 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.

KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolites from phagocytes. In: Inflammation – Basic Principles and Cinical Correlates. Raven Press, p. 541-588, 1992.

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.

KRAUS, J.; FRANZ, G. β-(1→3)-glucans: anti-tumor activity and immunostimulation. In LATGE, J.P.; BOUCIAS, D. (eds) **Fungal cell wall and immune response.** Springer-Verlang, p. 31-444, 1991.

LANG, P.; MASCI, G.; DENTINI, M.; CRESCENZI, D.V.; COOKE, D.; GIDLEY, M.J.; FANUTTI, C.; REID, J.S.G. Tamarind seed polysaccharides: preparation, characterisation and solution properties of carboxylated, sulphated and alkylaminated derivatives. **Carbohydr. Polym**. v. 17, p. 185-198, 1992.

LASFARGUES, A.M.A..; TAHIR-JOITI, M.A.; PEDRONT, T.; GIRARD, R.; CHABY, R. Effects of lipopolysaccharides on macrophages analysed with anti-lipid A monoclonal antibodies on polimyxin B. **European Journal of Immunology.** v. 19, p. 2219-2225, 1989.

LEW, W.; OPPENHEIN, J.J.; MATSUSHIMA, K. Analysis of suppression of IL-1 and production in peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. **J. Immunol.** v. 140, p. 1895-1902, 1988.

LIEW, F,Y.; YUN L.I.; MILLOTT, S. Tumor necrose factor-γ synergizes with IFN-γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.** v. 145, p. 4306-4310, 1990.

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, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.-R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan from the seeds of *Hymenaea coubaril* var. stilbocarpa. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n. 6, p. 413-415, 1995.

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.

LORENCE, E.P. Cell wall xyloglucan incorporation by xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in pine hypocotyls. **Plant Science**. v. 166, p. 1269-1274, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** São Paulo: Ed. Plantarum p. 152 e 155, 1992.

MACKAY, R.J.; RUSSEL, S.W. Protein changes associated with stages of activation of mouse macrophages for tumor cell killing. **J. Immunol**. v. 137, p.1392-1398, 1986.

MAcMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Ann, Ver, Immunol.** v. 15, p. 323-350, 1997.

MARLETTA; M.A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. **Cell**. v. 78, p. 927-930, 1994.

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. **Carbohydr. Polym.** v. 51, p. 347-356, 2003.

MARTÍNS-CABREJAS, M. A.; VALIENTE, C.; ESTEBAN, R.M.; MOLLÁ, E.; WALDRON, K. Cocoa Hull: A potential source of dietary fibre. **J. Sci. Food Agric**. v. 66, p. 307-311, 1994.

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 semisyntextic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. **Journal of Antimicrobial chemotherapy.** v. 39, p. 339-345, 1997.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and actio of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in Biochem. Sci.** v. 22, p. 477-481, 1997.

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.

MELLINGER, C.G.; CARBONERO, E.R.; NOLETO, G.R.; CIPRIANI, T.R.; OLIVEIRA, M.B.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. **Am Soc of Pharmacognosy.** In press. 2005.

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

MIYAZAKI, S.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; ENDO, K.; TAKAHASHI, A.; ATTWOOD, D. *In situ* gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochoride. **Int. J. Pharm**., v. 229, p. 29-36, 2001.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysilogy and Pharmacology. **Pharmacological Reviews.** v. 43, p. 109-142, 1994.

MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunol. Letters.** v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M.P.; ZAMPRONIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunol. Letters.** v. 93, p. 189-197, 2004.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SOCCOL, V.T.; OLIVEIRA, M.B.M. Yeast manna-vanadium (IV) complex and their effects on peritoneal macrophages. **Carbohydr. Polym**. v. 57, p. 113-122, 2004.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SOCCOL, V.T.; OLIVEIRA, M.B.M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Mol. Cel. Biochem**. v. 233, p. 73-83, 2002.

NUSSLER, A.J.; BILLIAR, T.R. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. **J. Leucocyte Biology**. v. 54, p. 171-178, 1993.

OHYA, Y.; NISHIMOTO, T.; MURATA, J.; OUCHI, T. Immunological enhancement activity of muramyl dipeptide analogue/CM-curdlan conjugate. **Carbohydr. Polym.** v. 23, p. 47-54, 1994.

OKASAKI, M.; CHIBA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Signal tranduction pathway on β-glucans triggered hydrogen peroxide production from macrophages, *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.** v. 19, p. 18-23, 1996.

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.

PARK, J.W.; BABIOR, B.M. The translocation of respiratory burst oxidase components from cytosol to plasma membrane is regulated by guanine nucleotides and diacylglycerol. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 19901-19906, 1992.

PARK, J.W.; MA, M.; RUEDI, J.M.; SMITH, R.M.; BABIOR, B.M. The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a Mr 240.000 complex that acquires a membrane binding site during activation of the oxidase in cell-free system. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 17327-17332, 1992.

PAULY, M.; FREIS, O.; PAULY, G. Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides. **Altured's Cosmetics & Toiletries**. v. 114, p. 65-78, 1999.

PERRIN, R.M.; DeROCHER, A.E.; BAR-PELET, M.; ZENG, W.; NORAMBUENA, L.; ORELLANA, A.; RAIKHEL, N.V.; KEEGSTRA, K. Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. **Science**, v. 284, p. 1976-1979, 1999.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al*. which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F.A.M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Rev. bras. Bot.** v.25, 2002. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042002000200007. Acesso em: 16 jun. 2005.

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

PROMEGA. Tecnical Bulletin Griess Reagent System – instruction for use of product G2930. Disponível em:www.promega.com/tbs Acesso em: 10 dez. 2005.

RAMAMOORTHY, L.; KEMP, M.C.; TIZARD, I.R. Acemannan, a β- (1→4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophages cell line raw 264.7. **Mol. Pharmacol.** v. 50, p. 878-884, 1996.

RAY, B.; LOUTELIER-BOURHIS, C.; LANGE, C.; CONDAMINE, E.; DRIOUCH, A.; LEROUGE, P. Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: Characterization of a novel xyloglucan motif. **Carbohyd. Res.** v. 339, p. 201-208, 2004.

REDGWELL, R. J.; MELTON, L. D.; BRASCH, D. J. Cell-wall polyssaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) chemical features in different tissue zones of fruit at harvest. **Elsevier Science Pub.** p. 241-258, 1988.

REDGWELL, R.J.; HANSEN C. E. Isolation and characterization of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. **Planta.** v. 210, p. 823-830, 2000.

REDGWELL, R.J.; TROVATO, V.; MERINAT, S.; CURTI, D.; HEDIGER, S.; MANEZ, A. Dietary fiber in cocoa shell: characterization of component polysaccharides. **Food Chem.**, v. 81, p. 103-112, 2003.

REILLY, T.P.; BELLEVEUE, F.H.; WORSTER, P.M.; SVESSON, C.K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Bioch. Pharmacol.** v. 55, p. 803-808, 1998.

REN, Y.; PICOUT, D.R.; ELLIS, P.R.; ROSS_MURPHY, S.B.; REID, J.S.G. A novel xyloglucan from seeds of *Afzelia africana* Se. Pers. Extraction, characterization and conformational properties. **Carbohydr. Res.** v. 340, p. 997-1005, 2005.

RENARD, C.M.G.C.; LEMEUNIER, C.; THIBAULT, J.-F. Alkaline extraction of xyloglucan from depectinized apple pomace: optimization and characterization. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, p. 209-216, 1995.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil, manual de dendrologia brasileira.** São Paulo: Edgard Blucher, 1978. p. 124-128

ROSE, J.K.C.; HADFIELD, K.A.; LABAVITCH, J.M.; BENNETT, A.B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 345-361, 1998.

ROTROSEN, D. The respiratory burst oxidase in inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Raven Press, p. 589-601, 1992.

RYVES, J.W.; EVANS, A.T.; OLIVER, PARKER, J.P.; EVANS, J.F. Activation of the PKC isotypes α, β1, γ, δ, ε by phorbol ester of different biological activities. **Fed. Eur. Biochem. Soc.**, Amsterdan, v. 288, n. 1-2, p. 5-9, 1991.

SAITÔ, H.; YOSHIOKA, Y.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y. Relationship between conformation and biological response for (1→3)β-D-glucans in the activation of coagulation factor G form limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. **Carbohydr. Res.** v. 217, p. 181-190, 1991.

SAKURAI, N.; NEVINS, D.J. Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp tissues. **Physiologia Planrarum**. v. 89, p. 681-686, 1993.

SAKURAI, T.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Intravenously administered (1→3)- β-glucan, SSG, obtain from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophages function *in vivo*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 40, p. 2120-2124, 1992.

SAMPEDRO, M.C.; ARTOLA, R.L; MURATURE, M.; MURATURE, D.; DITAMO, Y.; ROTH, G.A., KIVATINITZ,S. Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. **Int Immunophamacol.** v. 4, p. 411-418, 2004.

SASADA, M.; PABST, M.J.; JOHNSTON, R.B. Jr. Activation of peritoneal macrophages by lipopolisaccharides alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.** v. 258, p. 9631-9635, 1983.

SCHEPETKIN, A. I.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int. Immunopharmacol.** v.6, p.317-333, 2006.

SCHMIDT, H, H. H. W; WALTER, U. NO at work. **Cell.** v. 78, p. 919-925, 1994.

SEGAL, A.W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends Biochem. Sci.** v. 18, p. 43-47, 1993.

SHEPHERD, V.L.; LEE, Y.C.; SCLESINGER, P.H.; STAHL, P.D. L-Fucose-terminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptor on macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 78, p. 1019-1022, 1981.

SIDDIQUI, I.R.; WOOD, P.J. Structural investigation of sodium hydroxide-soluble

rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides. **Carbohydr**. **Res.**, v. 53, p. 85-94, 1977.

SIMS, I.M., MUNRO, S.L.A., CURRIE, G., CRAIK, D., BACIC, A. Structural characterization of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydr Res.**, 293, 147-172, 1996.

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.**, v. 6, p. 20-24, 1972.

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.

STAHL, P.D.; SCHLESINGER, P.H. Receptor-mediated pinocytosis of mannose/*N*-acetylglucosamine-terminated glycoproteins and lysosomal enzymes by macrophages. **Elsevier/North-Holland Biomedical Press**. p. 194-196, 1980.

STAHL, P.D.; WILLEMAN, T. E.; DIMENTE, S.; SHEPHERD, V.L. Mannose-specific oligosaccharides recognition by mononuclear phagocytes. **Biology of the cell.** v. 51, p. 215-218, 1984.

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

STORN, D.R.; ROSENTHAL, K.S.; SWANSON, P.E. polymyxin and related peptide antibiotics. **Annual Reviews Biochemistry**. v. 46, p. 723-763, 1977.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M.A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by GCG infection, lymphokines or interferon-γ. **J. Immunology**. v. 139, p. 518, 1987.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Aca. of Sci.** v. 82, p. 7738-7742, 1985.

STUELP-CAMPELO, P.M.; OLIVEIRA, M.B.M; LEÃO, A.A.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Effect of soluble α-D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celatri* macrophage activity. **Int. Immunopharmacol.** v. 2, p. 691-698, 2002.

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, J; ZHANG, X; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**. v. 3, p. 276-284, 2003.

SUN, X.; ANDREW, I.G.; JOBLIN, K.N.; HARRIS, P.J, McDonald [a], HOSKIN, S.O. Polysaccharides compositions of leaf cell wall of forage chicory (*Chicorium intybus* L.). **Plant Science**. v.170, p. 18-27, 2006.

TAKAHASHI, A.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; LOEBENBERG, R.; BACHYNSKY, J.; ATTWOOD, D. Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflamatory drugs *in situ* gelling xylolgucan formulations in rats. **Inter. J. Pharm.**, v. 246, p. 179-186, 2002.

TEIXEIRA, D.M.A. **Isolamento e caracterização de um par lectina-receptor endógeno de semente de *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle).** Fortaleza, 2005. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugar on paper chromatograms. **Nature.** v. 166, p. 444-445, 1950.

TSIAPALI, E.; WHALEY, S; KALBFLEISCH, J; ENSLEY, H.E.; BROWDER, W.I.; WILLIAMS, D.L. Glucans exhibit antioxidant activity, but stimulate macrophages free radical activity. **Free Radical Biology Medicine.** v. 30, p. 393-402, 2001.

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. Plant cell architecture. **Cell**, v. 56, p. 231-239, 1989.

VIERHIUS, E.; SCHOLS, H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Isolation and characterization of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv Koroneiki) at different ripening stages. **Carbohydr. Polym.**, v. 43, p. 11-21, 2000.

VIERHIUS, E.; SCHOLS, H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Structural characterization of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv Koroneiki). **Carbohydr. Polym**., v. 44, p. 51-62, 2001

VINCKEN, J.-P.; WIJSMAN, A. J. M.; BELDMAN, G.; NIESSEN, W.M.A.; VORAGEN, A.G.J. Potato xyloglucan is built from XXGG-type subunits. **Carbohydr. Res**., v. 288, p. 219-232, 1996.

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.

WAAGE, A.; BAKKE, O. Glucocorticoids suppress the production of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. **Immunology**. v. 63, p. 299-302, 1988.

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

WATT, D.K.; BRASCH, D.J.; LARSEN, D.S.; MELTON, L.D. Isolation, characterization, and NMR study of xyloglucan from enzymatically depectinized and non-depectinized apple pomace. **Carbohydr. Polym.**, v. 39, n.2, p. 165-180, 1999.

WHISTLER, R.L.; MASAK, E.J.; PLUNKETT, R.A. Cacao polysaccharides. **J. Am Chem. Soc**. v.78, p.2851-2853, 1955.

WHITE, A. R.; XIN, Y; PEZESHK, V. Xyloglucan glucosyltransferase in Golgi membranes from *Pisum sativum* (pea). **Biochem. J.** v. 294, p. 231-238, 1993.

WING, E.D.; REMINGTON, J.S. In: **Basic and Clinical Immunology**. P. 129-143, 1980.

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

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

WOODS, M. S.; MAYER, J.: EVANS, T.G.; HIBBS Jr., J.B. Antiparasitic effects of

nitric oxide in a *in vitro* model of *Clamydia trachomatis* infection and *in vivo* murine model for *Leishmania major* infection. **Immunology.** v. 60, p. 179-195, 1994.

YAMAGUCHI, T.; KANEDA, M.; Presence of cytochrome b-558 in guineapig alveolar macrophages subcellular localization and relationship with NADPH oxidase. **Biochemica et Biophysica Acta.** v. 933, p. 450-459, 1988.

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

YASHODA, H.M.;PRABHA, T.N.; THARANATHAN, R.N. Mango-ripenig chemical and structure characterization of pectic and hemicellulosic polysaccharides. **Carbohyd. Res**. v. 340, p. 1335-1342, 2005.

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

YORK, W.S.; KUMAR-KOLLI, V.S.; ORLANDO, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. **Carbohydr. Res.**, v. 285, p. 99-128, 1996.

YORK, W.S.; van HALBEEK, H.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ^{1}H-NMR spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydr. Res.**, v. 200, p. 9-31, 1990.

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.

ZHUANG, J.C.; WOGAN, G.N. Growth and viability of macrophages continuosly stimulated to produced nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 94, p. 11875-11880, 1997.

ANEXO