

IRENE ITALA TRIPPIA CECY

COMPLEXOS HEMICELULÓSICOS EM FOLHAS DE COFFEA ARABICA L.,
VAR. MUNDO NOVO, SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES À INFECÇÃO
POR HEMILEIA VASTATRIX BERK & BR.

Tese apresentada ao Departamento
de Bioquímica da Universidade Fe-
deral do Paraná, para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

CURITIBA

1984

Tese orientada pelo

Prof. Dr. João Batista Chaves Correa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. JOÃO BATISTA CHAVES CORREA, orientador desta tese, pelo estímulo, apoio e compreensão.

Ao Prof. P. A. J. GORIN, do Prairie Regional Laboratory, National Research Council of Canada, pelas análises de GC-MS e N.M.R.¹H.

Ao Prof. LUIS JULIANO, da Escola Paulista de Medicina, pelas análises quantitativas de aminoácidos.

À Prof^a SONIA M. C. DIETRICH, do Instituto de Botânica de São Paulo, pela orientação e cortezia de ter franqueado seu laboratório para o desenvolvimento da parte enzimática.

Ao Dr. ALCIDES CARVALHO, do Instituto Agronômico de Campinas, pela identificação da variedade Mundo Novo, do exemplar Coffea arabica L. em estudo. E, também, pelo fornecimento de folhas da variedade Mundo Novo (SH4).

Aos professores, pós-graduandos e funcionários dos Departamentos de Bioquímica e Botânica da UFPR pelo incentivo e colaboração.

Ao CNPq, CAPES e FINEP.

Aos meus entes queridos.

S U M Á R I O

1	-	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	-	Enquadramento taxonômico do cafeeiro.....	2
1.2	-	Parede celular.....	3
1.3	-	Proteínas da parede celular.....	14
1.4	-	Relação patógeno-hospedeiro.....	22
1.5	-	A <u>Hemileia vastatrix</u> Berk & Br.....	37
1.6	-	Proposição.....	39
2	-	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1	-	Material.....	46
2.2	-	Métodos.....	47
2.2.1	-	Métodos de extração.....	47
2.2.2	-	Métodos de fracionamento.....	48
2.2.3	-	Métodos analíticos gerais.....	51
2.2.3.1	-	Eletroforese.....	51
2.2.3.2	-	Polarimetria.....	51
2.2.3.3	-	Espectrofotometria.....	52
2.2.3.3.1	-	Região visível.....	52
2.2.3.3.2	-	Região I.V.....	52
2.2.3.3.3	-	Região U.V.....	52
2.2.3.3.4	-	Ressonância Nuc. Mag. Protônica.....	52
2.2.3.4	-	Índice de pH.....	52
2.2.3.5	-	Evaporações.....	53
2.2.3.6	-	Análises cromatográficas.....	53
2.2.3.7	-	Determinações quantitativas.....	55
2.2.3.8	-	Hidrólise ácida.....	56

2.2.3.9	- Redução e acetilação.....	58
2.2.4	- Métodos analíticos especiais.....	58
2.2.4.1	- Det. relativa monossac. neutros....	58
2.2.4.2	- Análise dos aminoácidos.....	59
2.2.4.3	- Filtração por gel sepharose.....	59
2.2.4.4	- Isolamento, metilação e análise dos ácidos aldobiurônicos.....	60
2.2.4.5	- Análise por metilação.....	61
2.2.4.6	- Hidrólise, redução e metilação do polissacarídeo metilado.....	62
2.2.4.7	- Degradação de SMITH.....	63
2.2.4.8	- Hidrólise ácida parcial da fração B-I (SUS).....	63
2.2.4.9	- Hidrólise alcalina da fração B-I (SUS).....	64
2.2.4.10	- Ação das enzimas intra e extracelulares.....	65
3	- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
4	- CONCLUSÕES.....	131
5	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
6	- APÊNDICE.....	157

LISTA DE TABELAS

I	- Propriedades e composição química das frações hemicelulósicas.....	69
II	- Hidrolisados das frações hemicelulósicas analisados como acetato de alditóis, por g.l.c.....	70
III	- Composição dos ácidos aldobiurônicos resultantes da hidrólise dos polissacarídeos com TFA.....	72
IV	- Aminoácidos das frações hemicelulósicas.....	74
V	- Análise por metilação das frações hemicelulósicas.....	79

VI	- Produtos obtidos de 3 sucessivas degradações de SMITH, das frações polissacarídicas, por g.l.c., na forma de acetato de alditóis.....	85
VII	- Produtos de 3 degradações seqüenciadas de SMITH, analisados por g.l.c., na forma de acetato de alditóis.....	86
VIII-	Oligossacarídeos resultantes da hidrólise ácida parcial da fração B-I(SUS), analisados por g.l.c., na forma de acetato de alditóis.....	93
IX	- Produtos resultantes da ação das enzimas extracelulares sobre as hemiceluloses <u>A</u> e <u>B</u>	102
X	- Produtos resultantes da ação das enzimas intracelulares sobre as hemiceluloses <u>A</u> e <u>B</u>	103
XI	- Caracterização do composto fenólico da hemicelulose <u>B</u> (SUS e RE).....	118

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	- Componentes da parede celular.....	5
2	- Estrutura das xiloglucanas.....	8
3	- Estrutura parcial de uma hemicelulose do tipo xilana.....	12
4	- Estrutura de parede celular de sicamore, proposta por KEEGSTRA et al.....	16
5.1	- Uredosporos de <u>H. vastatrix</u> com 5 tubos germinativos.....	41
5.2	- Tubo germinativo em desenvolvimento.....	41
5.3	- Tubo germinativo sobre o estômato da folha de cafeeiro.....	42
5.4	- Corte transversal da folha de cafeeiro mostrando micélio e haustórios de <u>H. vastatrix</u>	43
6	- Folha de cafeeiro atacada pela ferrugem.....	44
7	- Uredosporos de <u>H. vastatrix</u>	45
8	- Fracionamento dos polissacarídeos da parede celular de folhas de cafeeiro.....	49
9	- Fracionamento das hemiceluloses B-24.....	50

10	- C.p. dos aminoaçúcares das frações SUS.....	76
11	- Estrutura provável da xiloglucana.....	82
12	- Estrutura provável da glucoarabinoxilana.....	84
13.1	- Filtração em Sepharose 6B da fração B-I (SUS).....	87
13.2	- Filtração em Sepharose 6B da fração B-II (SUS).....	88
13.3	- Filtração em Sepharose 6B da fração B-III (SUS)...	89
13.4	- Filtração em Sepharose 6B da fração B-IV (SUS).....	90
13.5	- Filtração em Sepharose 6B da fração B-V (SUS).....	91
14	- C.p. dos oligossacarídeos da fração B-I (SUS).....	94
15	- T.l.c. de aminoácidos da fração B-I (SUS).....	95
16	- Perfil de eluição da fração B-I (SUS) em Bio Gel..	96
17	- T.l.c. dos oligossacarídeos da fração B-i (SUS)...	98
18	- C.p. dos monossacarídeos da fração B-I (SUS).....	99
19	- Estrutura parcial de peptidoglicana, segundo LAMPORTE.....	100
20	- C.p. dos monossacarídeos obtidos pela ação hidro- lítica das enzimas extracelulares sobre as fra- ções RE.....	104
21	- C.p. dos monossacarídeos obtidos pela ação hidrolítica das enzimas extracelulares sobre a hemicelulose <u>A</u> e frações SUS.....	105
22	- C.p. dos monossacarídeos obtidos pela ação hidrolítica das enzimas intracelulares sobre a hemicelulose <u>A</u> e frações SUS.....	106
23	- C.p. dos monossacarídeos obtidos pela ação hidrolítica das enzimas intracelulares sobre as frações RE.....	107
24.1	- Atividade da enzima extracelular sobre as frações B-I e B-V (SUS).....	108
24.2	- Atividade da enzima extracelular sobre as frações B-II e B-III (SUS).....	109
24.3	- Atividade da enzima extracelular sobre a hemicelulose <u>A</u> e fração B-IV (SUS).....	110

25.1	- Atividade da enzima intracelular sobre as frações B-I e B-V (SUS).....	111
25.2	- Atividade da enzima intracelular sobre as frações B-III e B-IV (SUS).....	112
25.3	- Atividade da enzima intracelular sobre a hemicelulose <u>A</u> e fração B-II (SUS).....	113
26	- Produtos da hidrólise enzimática analisados por g.l.c. na forma de acetato de alditóis.....	114
27	- Hidrólise do ácido clorogênico.....	117
28.1	- T.l.c. dos materiais não dialisáveis das frações SUS e RE.....	119
28.2	- T.l.c. dos produtos de metilação e hidrólise das frações SUS e RE.....	120
29.1	- Espectro de absorção I.V. do composto fenólico isolado: A - após 3 oxidações com NaIO ₄ , hidrólise, redução com NaBH ₄ e acetilação; B - após hidrólise com H ₂ SO ₄ , redução com NaBH ₄ e acetilação.	121
29.2	- Espectro de absorção I.V. do composto fenólico isolado: C - após hidrólise com Ba(OH) ₂ , separação cromatográfica, eluição em CH ₃ COOH 0,1N e nova hidrólise alcalina com redução simultânea; D - padrão de ácido clorogênico submetido aos mesmos tratamentos (A, B e C).....	122
30	- Espectro de U.V. do composto fenólico e do padrão de ácido clorogênico.....	123
31	- Ressonância nuclear magnética protônica do derivado fenólico e do padrão de ácido clorogênico....	124
32.1	- Espectro de massa do derivado de ácido clorogênico isolado da fração B-III (SUS).....	125
32.2	- Espectro de massa do derivado de ácido clorogênico isolado da fração B-I (SUS).....	126
32.3	- Espectro de massa do ácido clorogênico.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

- g.l.c. - cromatografia gás líquido.
t.l.c. - cromatografia em camada delgada.
c.p. - cromatografia de partição.
GC-MS - cromatografia gás líquido e espectrometria de massa
N.M.R.¹H - ressonância nuclear magnética protônica.
T - tempo de retenção.
TFA - ácido trifluoroacético.
AcO - acetato.
P.M. - peso molecular.
p/v - peso por volume.
v/v - volume por volume.
V - volt.
m.A - miliampere.
p.p.m. - partes por milhão.
r.p.m. - rotações por minuto.
d.i. - diâmetro interno.
nm - nanometro.
U.V. - ultra-violeta.
I.V. - infra-vermelho.
SUS - cultivar susceptível à ferrugem.
RE - cultivar resistente à ferrugem.
Xilp - xilopiranose.
Glu - glucose.
Ara - arabinose.
Gal - galactose.
Hyp - hidroxiprolina.
H. A - hemicelulose A.

RESUMO

Um estudo comparativo foi feito entre os polissacarídeos de folhas de Coffea arabica L., var. Mundo Novo, empregando-se cultivares resistentes e susceptíveis ao fungo causador da ferrugem do cafeeiro, Hemileia vastatrix Berk & Br.

A partir de fólhas livres de componentes lipofílicos e substâncias pecticas obteve-se uma população bruta de polissacarídeos extraídos com solução aquosa de KOH a 24% (p/v), dos quais a fração solúvel após neutralização a pH 5,0 (hemiceluloses totais B) e suas sub-frações obtidas mediante complexação com iodo e base quaternária de amônio foram objeto de determinação estrutural fina.

Nestas frações hemicelulósicas, aplicando-se técnicas hidrolíticas ácidas, alcalinas e enzimáticas, análises espectroscópicas, eletroforéticas e cromatográficas em polímeros nativos ou previamente submetidos à metilação ou degradação de SMITH, determinou-se as seguintes propriedades comuns aos dois tipos de cultivares:

a) presença, em proporções variáveis, dos monossacarídeos L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, D-manose, D-galactose, D-glucose, ácido D-glucurônico e 4-O-metil-D-glucurônico, como integrantes das estruturas poliméricas;

b) grande proporção de grupamentos terminais não redutores, indicativa de alto grau de ramificação das hemiceluloses, envolvendo resíduos arabinofuranosil, xilopiranosil, glucopiranosil e galactopiranosil;

c) a presença de 2,3,6-tri-O-metilglucitol nos hidrolisados de frações metiladas, indicando que a ligação mais abundante envolvendo D-glucose é do tipo $\beta,1 \rightarrow 4$, a ocorrência de derivados metilados dos tipos 4,6- e 3,4-di-O-substituídos, respectivamente para D-glucose e D-galactose envolvidas em pontos de ramificação;

d) na análise dos produtos de degradação de SMITH determinou-se o glicerol como produto predominante e provindo principalmente de resíduos xilopiranosil de segmentos lineares envolvendo ligação glicosídica do tipo $1 \rightarrow 4$ e de resíduos hexopiranosil ou arabinofuranosil terminais não redutores. Eritritol e treitol foram outros polióis detectados em menores proporções;

e) a ligação de compostos fenólicos a polímeros hemicelulósicos, sendo que a caracterização do derivado ácido di-O-acetilcafêico evidencia a participação do ácido clorogênico na referida ligação;

f) as frações hemicelulósicas são passíveis de degradação enzimática por parte de hidrolases isoladas do fungo Hemileia vastatrix. A depolimerização máxima é alcançada entre 20 e 28 horas de incubação a 40°C e revelou-se mais eficiente com enzimas extracelulares do que com as intracelulares.

Por outro lado, encontrou-se os seguintes resultados diferenciais entre as hemiceluloses B dos dois cultivares estudados:

a) a detecção de 2-acetamido-2-deoxi-D-galactose apenas em cultivares susceptíveis à H. vastatrix;

b) maior grau de ramificação nas frações hemicelulósicas de cultivares resistentes à H. vastatrix, evidenciado pela maior porcentagem do derivado mono-metilxilitol.

Finalmente, comprovou-se que a ligação covalente entre

carboidrato e proteína de proteoglicanas de cultivares susceptíveis à H. vastatrix envolve a participação de L-arabinose e L-hidroxiprolina através de uniões do tipo O-glicosídica.

1 - I N T R O D U Ç Ã O

O Brasil ocupa uma folgada liderança entre os 47 países produtores de café. Para a safra 83/84 está prevista uma colheita de 91,7 milhões de sacas de 60 quilos, devendo nosso País contribuir com 30 milhões de sacas, ou seja, cerca de 32% da produção mundial. Destas, 17 milhões destinar-se-ão à exportação, o que propiciará uma receita cambial entre 2 e 2,2 bilhões de dólares. Portanto, no contexto geral das exportações brasileiras, o café deverá contribuir neste ano com 8 a 9% do orçamento de divisas do nosso comércio exterior. A Colômbia, segundo maior produtor, tem sua safra atual calculada em 16 milhões de sacas. 110,181,225,249

A citação destes dados é oportuna para destacar a importância da lavoura cafeeira. O seu desempenho é acompanhado de perto pelas autoridades agrícolas e econômicas, pois qualquer fator capaz de prejudicá-lo deve ser imediatamente afastado ou, quando isto não for possível, ter seus efeitos minimizados.

A ferrugem, causada pelo fungo Hemileia vastratrix Berk & Br., é um desses fatores. Seu combate constitui-se em preocupação constante e várias instituições dedicam-se ao seu estudo, quer pesquisando fungicidas mais eficazes, quer desenvolvendo cultivares resistentes.⁶² Em qualquer desses aspectos é indispensável conhecer-se a constituição química, a fisiologia

e os mecanismos de defesa do cafeeiro, bem como o bioquimismo, os modos de ação e os processos de propagação do fungo.

Este trabalho é uma contribuição no sentido do melhor conhecimento químico da folha do cafeeiro e dos mecanismos de ação do fungo causador da ferrugem.

1.1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DO CAFEIEIRO

Divisão: Angiospermae

Classe: Sympetalae (Metachlamydeae)

Sub-classe: Dicotyledoneae

Ordem: Gentianales

Família: Rubiaceae

Sub-família: Coffeoidae

Tribo: Ixoreae

Gênero: Coffea

Espécie: Coffea arabica L. ^{231,268}

A confirmação da espécie foi feita por comparação de nosso material seco, com exsicatas de herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná. A variedade Mundo Novo foi confirmada no Instituto Agronômico de Campinas, pelo Dr. Alcides Carvalho.

O cafeeiro, C. arabica L., é um arbusto capaz de atingir até 4 metros de altura. Suas flores são brancas e seus frutos podem ser cápsulas, drupas ou bagas, contendo duas sementes. ^{73,152,209,279} As folhas são inteiras, lanceoladas, acuminadas, ligeiramente coriáceas, com pecíolo curto e coloração verde escura. Acham-se parcialmente unidas na base, por meio de estípulas interpeciolares efêmeras. ^{73,209}

A variedade Mundo Novo, surgiu no Município de Novo Mun-

do, hoje Urupês, Estado de São Paulo, em 1943. Sua seleção tem sido realizada no Instituto Agrônomo de Campinas, desde 1943, produzindo linhagens altamente produtivas. É obtida pelo cruzamento natural de uma variedade de C. arabica, procedente da Sumatra, com a variedade Bourbon vermelho.⁵²

1.2 - PAREDE CELULAR

A estrutura da parede celular vegetal tem sido alvo de muitos estudos devido a sua importância biológica. Dela dependem a morfologia e o desenvolvimento das células vegetais, bem como as interações entre as plantas hospedeiras e os agentes patogênicos. O seu desenvolvimento está condicionado à necessidade de alongamento da parede celular primária, que por sua vez depende de forças de turgor e de hormônios de crescimento.^{203,233} A estrutura da parede celular em diferentes órgãos de uma mesma planta ou de plantas diferentes apresentam características moleculares próprias relacionadas, possivelmente, com suas diversas funções.

Sabe-se que a célula vegetal é constituída por um protoplasto envolvido por um invólucro protetor, a parede celular. O protoplasto revestido internamente pela membrana plasmática, é constituído por elementos protoplasmáticos (citoplasma, núcleo, mitocôndrias e plastídeos) e elementos não protoplasmáticos (vacúolos, cristais, grãos de aleurona, etc.). A parede celular contém, além de moléculas de polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectinas e mucilagens), também proteínas, lipídeos e lignina. Sua estrutura apresenta-se fundamentalmente formada por três regiões distintas: a) lamela média, formada de pectato de cálcio e magnésio; b) parede celular primária;

c) parede celular secundária. Sobre esta última encontram-se impregnações de diferentes naturezas: cutina, suberina, lignina, sílica, mucilagens, ceras e carbonato de cálcio.¹⁰⁷

A lamela média, lâmina de pectato de cálcio e magnésio, tem como constituinte um material cimentante e sua função é ligar paredes de células vizinhas entre si.

A parede celular primária, com uma organização definida, é a mais importante, pois desempenha um papel ativo durante todo o crescimento celular.^{177,245} Sendo característica de tecidos jovens, é encontrada em coleóptiles, hipocótilos, internós de muitos caules e em tecidos cambiais. Cerca de 90% do material estrutural deste tipo de parede, acha-se constituído por polissacarídeos e 10% por uma proteína estrutural, rica em hidroxiprolina, a extensina, cuja função foi descrita por LAMPORT.¹⁷⁹ A hidroxiprolina na parede celular primária constitui cerca de 30% dos amino-ácidos totais e 2 a 10% da parede celular vegetal. LAMPORT¹⁷⁶ determinou a natureza da ligação glicosídica entre os resíduos de hidroxiprolil e unidades de arabinose, que ocorrem através do grupo hidroxil.

Em muitas plantas superiores a parede celular primária possui características comuns; às vezes, uma semelhança estrutural e, outras vezes, diferenças relacionadas com as funções de maturação celular.

Na parede celular primária, as microfilbrilas de celulose entrecruzam-se sobre a lamela média de maneira inicialmente frouxa e desordenada, adquirindo posteriormente uma ordenação paralela em sentidos diferentes, constituindo as 4 subcamadas S_1 , S_2 , S_3 e S_4 , observadas em microscópio eletrônico.^{179,300} A ordenação dessas microfibrilas de celulose resultam em proprie-

dades elástica e plástica para a célula.

A parede celular secundária forma-se quando a célula para de crescer, mostrando composição e ultra-estrutura variável de célula a célula.

As células vegetais no decorrer de seu desenvolvimento mostram mudanças em sua forma, função e estrutura, ocorrendo, portanto, variações rápidas de seus constituintes.²¹⁷

Apesar das diferenças existentes entre si, as paredes celulares possuem uma integração quanto à sua composição química e seu grau de organização.¹¹¹

Os polissacarídeos constituintes da parede celular, podem ser reunidos em 3 grupos distintos, segundo a sua solubilidade e a sua composição química: substâncias pecticas, hemiceluloses e celulosas.¹¹¹ Além dessas ocorrem substâncias não polissacarídicas tais como compostos polifenólicos (lignina, ácido clorogênico e seus derivados, ácido ferrúlico e seus derivados) e proteínas (Fig. 1)

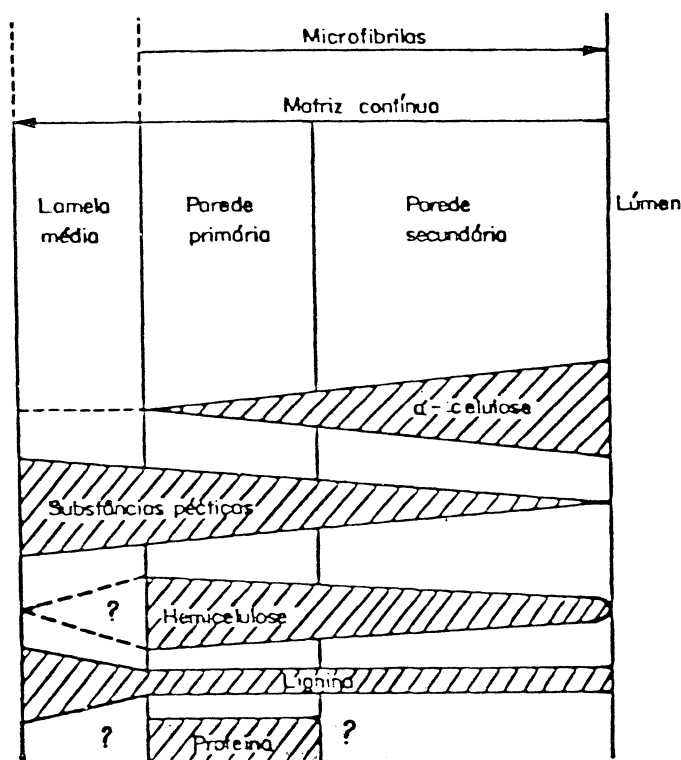


Fig. 1 - Componentes da Parede Celular

Como este trabalho prende-se principalmente ao estudo de componentes hemicelulósicos que formam complexos com proteínas e compostos fenólicos, é feita, a seguir, uma revisão de algumas de suas características.

Hemiceluloses

O termo "hemicelulose" foi introduzido por SCHULZE, em 1891, para caracterizar polissacarídeos extraídos de tecidos vegetais com álcali.

Hemiceluloses podem ser definidas como polissacarídeos de parede celular e intercelular extraídos de tecidos lignificados e não lignificados de plantas. O termo pode ser estendido também a carboidratos existentes em endosperma de cereais, constituindo os polissacarídeos não amiláceos, descritos como gomas de cereais ou pentosanas.³⁰⁷

TIMELL,²⁸⁶ por sua vez, define hemiceluloses como sendo polissacarídeos de baixo peso molecular, que nos tecidos vegetais encontram-se associados com a celulose.

BAUER et al.⁴¹ sugerem que o termo hemicelulose seja usado só para aqueles polissacarídeos de parede celular que se unem às microfibrilas de celulose por ligação não covalente.

As hemiceluloses constituem os maiores componentes da parede celular primária e secundária e podem ser encontrados em parede celular de cotilédones, de endosperma, de caule e de folha de uma grande variedade de plantas. Distribuem-se em vários tecidos e células da madeira, de traqueídeos, de fibras, etc.

Funcionalmente interconectam as fibrilas de celulose aos polissacarídeos pécticos da parede celular. Esta função baseia-se na capacidade que tem as hemiceluloses de se ligarem não covalen-

temente à celulose e covalentemente ao material pectico, através de ligações glicosídicas de seus terminais redutores.^{41, 220, 282}

As hemiceluloses são, principalmente, constituídas de xilanas, xiloglucanas, arabinoxilanas, arabinogalactanas, mananas, galactanas, arabinanas e glucanas não celulósicas, variando de tecido para tecido. Estão presentes como os maiores componentes da parede celular e sua composição varia com o crescimento e maturação do vegetal. Em mesofilo de folhas, tecido endospermico e paredes celulares primárias ocorrem hemiceluloses, que provavelmente assemelham-se às aquelas encontradas em gramas.³⁰⁷

Em folhas desenvolvidas de capim branco, aveia, cevada, trigo e capim dos pampas, os valores de hemiceluloses variam entre 21 a 37%, enquanto que para a celulose os valores oscilam entre 27 a 36%. Em gramas, o maior aumento em componentes hemicelulósicos ocorre nos períodos de crescimento. Em caules e folhas jovens a composição hemicelulósica é semelhante, porém, em folhas mais velhas encontram-se maiores proporções de arabinose e galactose.³⁰⁷

Xiloglucanas

São as constituintes principais da parede celular primária de Dicotyledoneae. Estruturalmente, apresentam uma cadeia principal de resíduos de D-glucopiranose ligados $\beta, 1 \rightarrow 4$, com ramificações terminais de resíduos de D-xilopiranose ligados $1 \rightarrow 6$ (Fig. 2).

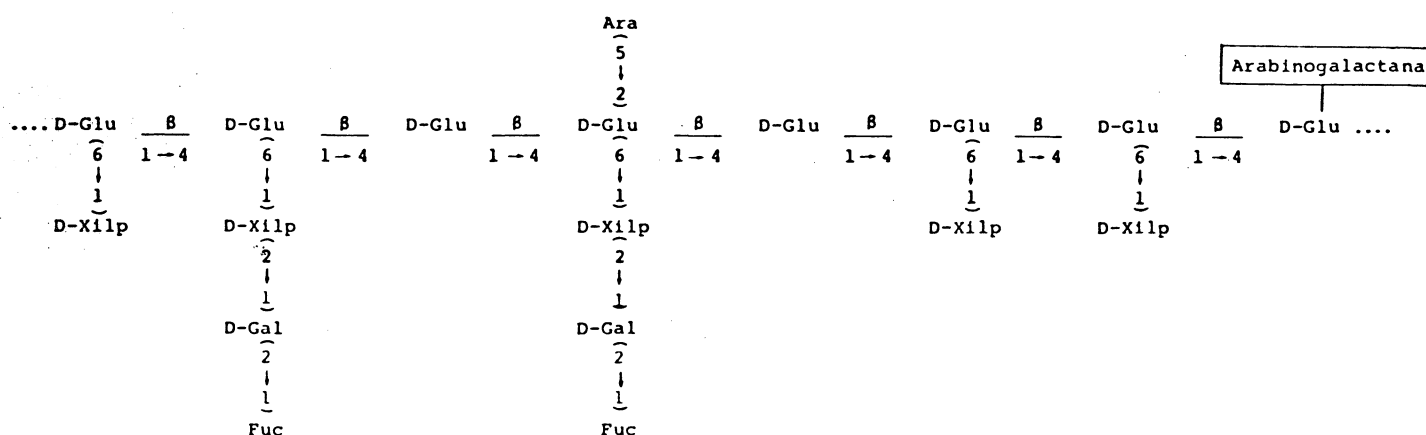


Fig. 2 - Estrutura das xiloglucanas, seg. ALBERSHEIM et al.¹³

As xiloglucanas ligam-se covalentemente às pectinas e por pontes de hidrogênio à superfície de fibrilas de celulose.^{41,293} ALBERSHEIM^{13,14} observou que as fibrilas de celulose unem-se à xiloglucana por pontes de hidrogênio, porém num só sentido, pois em sentido oposto encontram-se as cadeias laterais de galactose e de fucose. Esse mesmo autor observou também que em parede celular primária as xiloglucanas unem-se a arabinogalactanas e, estas, a ramnogalacturonanas.

Xiloglucanas provenientes de diferentes fontes tem apresentado a mesma unidade repetitiva de heptassacarídeo formado de resíduos de celotetraosil, ao qual acham-se unidos cadeias laterais de 3-monoxilosil com ou sem substituintes de galactosil ou fucogalactosil.²⁰⁶ As Monocotyledoneae apresentam uma xiloglucana com estrutura semelhante a essa, porém, com menor proporção de seus constituintes.

Sua função biológica é desconhecida. Não se sabe se são precursoras ou produtos de transformação provenientes de celulose.²⁶ Seu papel mais definido acha-se relacionado com o alongamento de tecidos vegetais induzidos pela auxina.^{149,293}

Em Monocotyledoneae, tais como, trigo, aveia, arroz, cana de açúcar, foi observado que a estrutura dos polissacarídeos da parede celular primária pode ser construída com base nos princípios fundamentais aplicados às células de sicamore (Acer pseudoplatanus).¹⁴ O mesmo não ocorre com polissacarídeos de parede celular secundária, onde a composição e estrutura variam de célula para célula.

Xiloglucanas foram isoladas de uma grande variedade de vegetais como, por exemplo, de parede celular de hipocótilo de Phaseolus aureus,¹⁵⁹ de Phaseolus vulgaris,^{304,305} de sementes de Tamarindus indica,^{271,301} de Tropaeolum majus,^{80,146} de Annona muricata,¹⁷⁰ de Brassica campestris,^{33,265} de Brassica alba,¹²¹ de casca de Picea engelmanni,²⁷⁶ de madeira de Picea rubens,²⁷⁶ de células de calo de Acer pseudoplatanus,²⁹ de Glicine max,²⁷⁶ de Vigna sesquipedalis,²⁷⁶ de hipocótilo de feijão Mung,^{160,161} de endosperma de arroz,^{162,262,263} de folhas de Nicotiana tabacum,^{7,8,97,264} de cultura de células de tabaco,⁶ de folhas de couve,²⁷⁷ de parede celular de arroz,²²⁸ de parede celular do embrião de alface,⁶³ de Berberis vulgaris,¹³⁶ de células cambiais de Populus tremuloides e de Tilea americana.²⁷⁶

As xiloglucanas quando tratadas com iodo 0,15M e iodeto de potássio, formam complexos de coloração castanho escura à violeta, exceção feita ao de Acer pseudoplatanus,²⁹ devido provavelmente à presença de proteínas nas preparações estudadas.

GOULD et al.¹²¹ e KOOIMAN,¹⁶⁹ estudando a formação de complexos com iodo de substâncias amilóides, provenientes de Brassica alba e de Tamarindus indica, observaram que as moléculas ou ions de iodo penetram nos interstícios formados entre as moléculas das xiloglucanas, associando-se com as cadeias de glúcase de celulose. Por hidrólise enzimática da xiloglucana de T. indica, KOOIMAN obteve unidades de glucopiranosil e de xilopiranosil, ligadas como cadeias laterais a C-6 da unidade de glucopiranosil. Por esse resultado concluiu que essa xiloglucana é estruturalmente semelhante ao de sicamore²⁹ e de outras sementes amilóides como, por exemplo, a de Tropaeolus majus¹⁴⁶ e de Brassica campestris,^{265,266}

BARRY & ALBERSHEIM,³⁰⁵ trabalhando com Phaseolus vulgaris, isolaram uma xiloglucana que se encaixa perfeitamente dentro do modelo estrutural proposto por BAUER et al.⁴¹ ao qual atribuíram uma importante função de ponte de ligação entre polissacarídeos da parede celular.

Como o sicamore e o feijão, embora pertençam a famílias muito distantes na taxonomia vegetal, apresentaram hemiceluloses com estrutura molecular comum, é provável que o mesmo possa ocorrer com outras plantas.

As xiloglucanas tem sido encontradas predominantemente em sementes de vegetais, todavia algumas delas foram isoladas também de madeiras de algumas Angiospermae, tais como Acer rubrum, Betula papeyifera, Fagus grandifolia e Ulmus americana.²⁷⁶

Xiloglucanas isoladas de parede celular de Phaseolus aureus, Glicine max, de hipocótilo de Vigna sesquipedalis e de cotilédones de Phaseolus vulgaris, apresentaram um esqueleto co-

mas às demais xiloglucanas, com cadeias laterais de xilose, galactose e fucose. Já em Simmondsia chinensis a xiloglucana não possui fucose como cadeia lateral.²⁹⁵

Observou-se também que as arabinoxiloglucanas isoladas de folhas de Nicotiana tabacum e de cultura de células de tabaco são estruturalmente semelhantes entre si e entre o encontrado no sicamore e no feijão.^{6,264}

Em Brassica campestris foi isolada uma xiloglucana com um esqueleto comum aos demais, porém com cadeia lateral formada por unidades de β -glucopiranosil ligadas através de 1 \rightarrow 6 e com unidades terminais de galactopiranosil.

Em parede celular de bulbo de Allium cepa foi identificada uma xiloglucana, contrariando o que era esperado para Monocotyledoneae, isto é, arabinoxilanas.¹⁹³

Ainda, de parede celular de S. tuberosum, isolou-se uma xiloglucana que difere das isoladas de Solanaceae, por ter arabinofuranose como grupo terminal não redutor.^{239,241}

Assim, observa-se que todas as xiloglucanas estudadas possuem um esqueleto comum, formado por unidades de β -D-glucopiranosil ligados através 1 \rightarrow 4 diferenciando-se entre si quanto a natureza química de suas cadeias laterais.

Como as cadeias das xiloglucanas acham-se, possivelmente, conectadas às fibrilas de celulose no interior da parede celular por ligações de hidrogênio, é improvável que tal conexão ocorra no ponto da parede celular onde haja a regulação do alongamento celular.¹⁷³

LABAVITCH e RAY¹⁷³ acharam, no entanto, que um polímero como xiloglucana poderia sofrer uma modificação rápida na parede celular, em resposta ao tratamento pela auxina.

Em sementes de ervilha foi observado que as características de alongamento celular induzidas por ácido são semelhantes àquelas induzidas pela auxina, ocorrendo uma diminuição no pH do meio de incubação. Essa observação de que íons H^+ podem alterar a resistência ou velocidade de síntese das ligações dentro da parede celular, leva a crer que tais ligações podem ser as mesmas que controlam a velocidade de alongamento celular.^{13,149} Tal hipótese tem sido sustentada por KEEGSTRA et al.¹⁶³ e por RING & SELVENDRAN.²⁴¹

Glucuronoxilanas

As glucuronoxilanas possuem um esqueleto formado por unidades de xilopirranose unidas por ligações tipo $\beta, 1 \rightarrow 4$, encontrando-se muito distribuídas em plantas superiores. Estes compostos possuem a cada 10 unidades de xilopirranose, unidades de ácido 4-0-metil-D-glucurônico ligadas a C-2 ou C-3 da cadeia principal e, frequentemente, cadeias laterais formadas por unidades de arabinofuranose ligadas $\beta, 1 \rightarrow 3$ ou por unidades de D-glucopirranose ligadas $\beta, 1 \rightarrow 2$. Os números e tipos de unidades que participam das ramificações são característicos de diferentes grupos de plantas. Algumas glucuronoxilanas, por exemplo, aquelas encontradas em madeira dura (Betula verrucosa³⁰⁷ e Mimosa escabrella^{78,91}) encontram-se na natureza geralmente acetiladas nas posições C-2, C-3 ou em ambas.^{120,223,300} (Fig. 3)

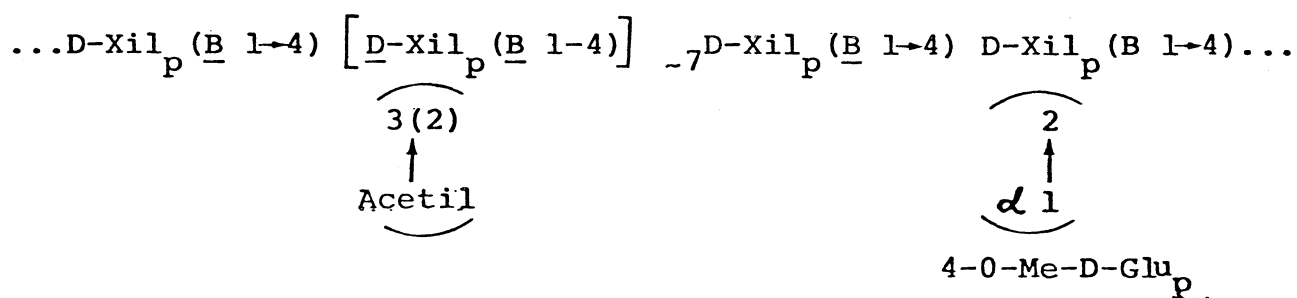


Fig. 3 - Estrutura parcial de uma hemicelulose do tipo glucuronoxilana.¹²⁰

As glucuronoxilanas foram isoladas em grande quantidade de tecidos endospérmicos e de tecidos não endospérmicos de muitas Gramineae economicamente importantes. Em gramas e cereais as glucuronoxilanas não endospérmicas possuem estruturas semelhantes, embora no milho, fibras e casca de vagem possuam uma estrutura mais complexa. Arabinoxilanas foram muito estudadas em Gramineae,^{60,307,308} onde ocorre um maior teor em arabinose do que naquelas isoladas de Leguminosae.¹¹³ As glucuronoxilanas foram também isoladas de hemicelulose A de folhas de cafeeiro susceptíveis à ferrugem.²⁹⁸

Arabinoxilanas

As arabinoxilanas foram as primeiras hemiceluloses endospérmicas isoladas e estudadas detalhadamente.

Em Dicotyledoneae 19% da parede celular primária é constituída por hemicelulose do tipo xiloglucana, enquanto que apenas 5% é formada por glucuronoarabinoxilana.⁸³

Em Monocotyledoneae ocorre o contrário, isto é, 25% da parede celular primária é constituída por glucuronoarabinoxilana e somente 2% por xiloglucana.

As glucuronoarabinoxilanas de ambas as fontes são provavelmente semelhantes, pois, nos dois casos, apresentam-se formadas por um esqueleto de unidades de D-xilopiranosil unidas através de ligações tipo $\beta,1 \rightarrow 4$, com cadeias laterais ácidas ou neutras unidas a C-2 ou a C-3.

Como o esqueleto de arabinoxilana é semelhante ao encontrado em xiloglucana, supõe-se que esteja ligada à celulose por uma interação semelhante àquela encontrada em xiloglucana de sicamore.^{163,307} Portanto, a função das arabinoxilanas encontra-se relacionada com a estrutura da parede celular.

Arabino-4-0-metilglucuronoxilanas foram isoladas das mais variadas fontes, como, por exemplo, da hemicelulose da madeira,²⁸⁶ de parede primária de Acer pseudoplatanus,⁸³ de parede celular de aleurona de cevada,¹⁸⁵ de cascas de Cinnamomum inners,¹²² de gramas,^{27,58,155,156} de palha, endosperma e folha de trigo,^{3,28,240,262,263} de casca de grãos de sorgo,^{312,313} de uma grande variedade de tecidos de Monocotyledoneae,^{54,83,189,300} de caules e folhas de C. plectostachyus, de casca da Plantago ovata,¹⁶⁴ de parede celular de endosperma de arroz,^{262,263} de coleoptile e caule de aveia,^{57,60,173,294} de folhas novas e brotos de bambu,^{190,191,306} de folhas de couve.²⁷⁷

L-arabino-D-xilose pode ocorrer também como um componente neutro associado à celulose, encontrado, por exemplo, em várias mucilagens procedentes de sementes ácidas, como o linho e o plantago. Como o produto obtido da degradação de L-arabinose-D-xilose de semente de linho foi o 4-0-metil-B-D-xilopiranosil-D-xilose, supõe-se ser o seu núcleo semelhantes ao de polissacarídeo do tipo D-glucuronoxilana.^{31,32}

É muito provável que ligações não covalentes que unem cadeias de arabinoxilanas entre si, ou entre elas e fibras de celulose, sejam as responsáveis pela resistência das paredes.¹⁵⁸

BURKE et al.⁶⁰ estudaram comparativamente paredes celulares de Monocotyledoneae e Gimnospermae e constataram algumas semelhanças estruturais.

1.3 - PROTEÍNAS DA PAREDE CELULAR

Entre os constituintes não celulósicos da parede celular ocorre em muitas plantas superiores e inferiores uma proteína rica em trans-4-hidroxiprolina, chamada extensina, descoberta

por STEWARD & THOMPSON²³⁵ em hidrolisados de tecidos vegetais. Em paredes celulares que proliferam de modo desorganizado (parede celular primária) constatou-se uma maior presença de hidroxiprolina do que em paredes de tecidos organizados.¹⁷⁴ A contínua chegada de hidroxiprolina à parede celular pode ser determinada através do seu desaparecimento do citoplasma, o que foi confirmado por OLSON²²⁴ em cultura de células de tabaco e por CLELAND^{74, 75, 76} em coleóptile de aveia.

A extensina é uma glicoproteína que se deposita na célula durante a maturação da parede celular primária. O grupo prostético é constituído principalmente de galactose e arabinose. Esta última une-se ao grupamento hidroxil da hidroxiprolina por ligações tipo O-glicosídicas, que são estáveis ao tratamento de álcalis.^{24, 167, 175, 201, 258, 261} A galactose, por sua vez, liga-se possivelmente por uma união covalente à serina.¹⁷⁹

Glicoproteínas com ligação arabinose-hidroxiprolina estão amplamente distribuídas no reino vegetal tendo sido constatadas em algas vermelhas, hepáticas, cavalinhas, musgos, samambaias, bem como Mono e Dicotyledoneae¹⁷⁸

Hidroxiprolina é melhor conhecida como um componente do colágeno ou de uma proteoglicana de plantas com sementes. Esse aminoácido tem sido encontrado em cultura de células vegetais,^{174, 177, 232, 281} em endosperma e farelo de arroz,^{262, 314} em tecidos de vegetais em crescimento, em folhas de Vicia faba,²³⁵ em gomas e farinha de trigo,¹⁰⁹ em mucopolissacarídeo de sementes,^{51, 121} em algas vermelhas,⁷⁹ em mucilagem de Rodella.¹⁰⁵ Todavia, sua presença não tem sido confirmada em parede celular de aleurona de grãos de cereais.¹⁹⁸

Mucopolissacarídeos extraídos de sementes e de calo de

sicamore apresentam uma ligação proteína-carboidrato do tipo hidroxiprolil glucosídeo ou galactosídeo.^{109,232} Esse tipo de ligação foi encontrado também em algumas algas^{134,135,199,285} e em endosperma de trigo.¹⁰⁹

KEEGSTRA et al.¹⁶³ propuseram um modelo para a parede celular primária em que a proteína estrutural liga-se a material pético através da fração arabinogalactana (Fig. 4).

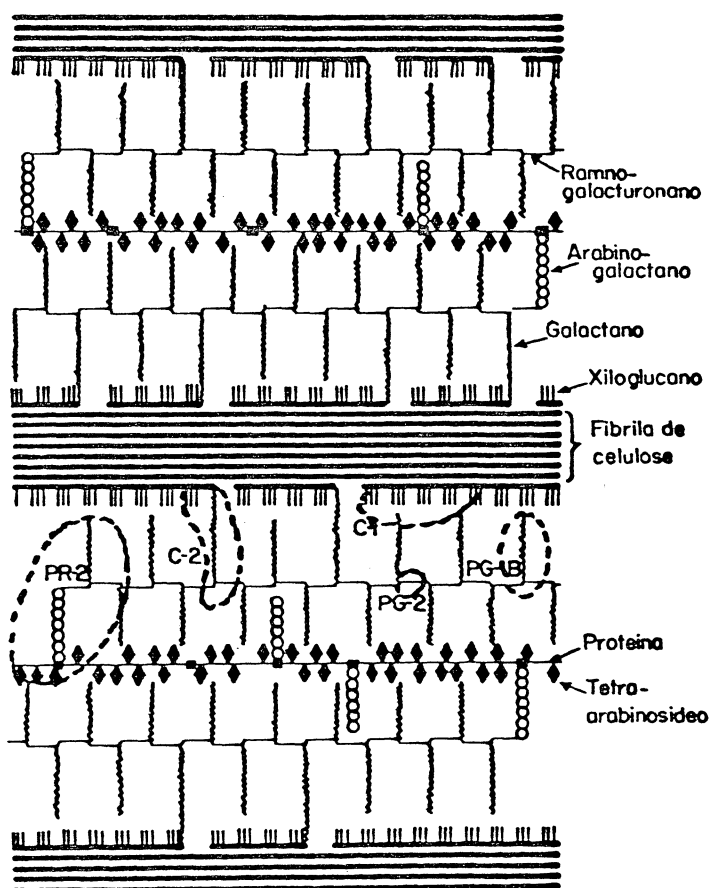


Fig. 4 - Estrutura de parede celular de sicamore, proposta por KEEGSTRA et al.¹⁶³ As áreas circulares representam as frações da parede liberadas por enzimas degradativas. Endopoligalacturonase liberou as fr. PG-1B e PG-2; endoglucanase liberou as fr. C-1 e C-2 e pronase liberou a fr. PR-2.

LAMPOR¹⁷⁶ sugeriu que 30% dos aminoácidos da parede celular de tomate acha-se constituída de hidroxiprolina, que esta-

ria em grande parte (70%) covalentemente unida a glicosídeos. O mesmo autor considera que as proteínas ricas em hidroxiprolina possuem uma função estrutural, atuando como pontos de ligações entre as moléculas de polissacarídeos da parede celular.¹⁷⁴ Em virtude de ocorrerem em quantidades significativas é provável que essa glicoproteína influa na resistência da parede celular. Como essa resistência sofre variações nas fases de crescimento em extensão, tal glicoproteína foi denominada de extensina.^{174,204}

Pouco se sabe sobre a síntese ou degradação da extensina. Segundo alguns autores, ela se forma nos polissomas.^{68,84}

SADAVA & CHRISPEELS²⁴⁸ consideram que a prolina presente no oligopeptídeo é a precursora na formação da hidroxiprolina. A hidroxilação da prolina ocorre em posição trans-4 de peptidilprolina, catalizada por uma enzima citoplasmática.

DASHEK⁸⁴ constatou que a extensina é transportada à parede celular por um mecanismo envolvendo membranas lisas.

CHRISPEELS,⁶⁷ em experiências com discos de parênquima floemático de cenoura, usando ¹⁴C-prolina, observou que a extensina é rapidamente transferida para dentro da parede celular, não se conhecendo quais as enzimas responsáveis pela glicosilação ou pela degradação específica.

Hidroxiprolil glicosídeos isolados por degradação alcalina ou enzimática foram identificados como tri ou tetrassacarídeos de arabinose ligadas ao C₄ da hidroxiprolina.^{175,176,178,204} Os quatro resíduos de arabinose unem-se por três diferentes tipos de ligações à hidroxiprolina. LAMPORT^{175,176} constatou que a ligação entre a arabinose e a hidroxiprolina é do tipo O-glicosídica, enquanto as

demais ligações glicosídicas são do tipo 1,2- e 1,3-, catalizadas por diferentes enzimas.

A estrutura de glicoproteínas da parede celular observada em Acer pseudoplatanus, por HEAT e NORTHCOTE,¹³⁵ está em concordância com LAMPORT.¹⁷⁶

KARR,¹⁵⁸ CHRISPPEELS⁶⁷ e DASHEK⁸⁴ observaram que glicoproteínas citoplasmáticas ricas em hidroxiprolina são precursoras de glicoproteínas da parede celular.

SELVENDRAN et al.,^{257,258} em experiências com Phaseolus coccineus, isolaram duas glicoproteínas com diferentes teores de hidroxiprolina. Os mesmos autores constataram que a glicoproteína mais pobre nesse aminoácido liga-se à fração hemicelulósica da parede celular.

BROWN & KIMMINS^{53,54,55} isolaram de sementes de Phaseolus vulgaris glicoproteínas pobres em hidroxiprolina. Nelas constataram que a arabinose e a galactose uniam-se à hidroxiprolina e serina, respectivamente. A arabinose estaria unida à hidroxiprolina por ligações do tipo (1→2)-, (1→3) ou (1→5). A ligação (1→5)- da arabinose provavelmente, fixa glicoproteínas pobres em hidroxiprolina à matriz da parede celular, atuando como pontos de ligações entre moléculas de polissacarídeos, conforme já mencionada para a extensina.

LAMPORT¹⁷⁴ e TALMADGE²⁸¹ sustentam que glicoproteínas unem-se às hemiceluloses através de cadeias laterais de galactose e não de arabinose. Outros autores,^{135,201,258,262} no entanto, propõem que essa proteína rica em hidroxiprolina esteja diretamente ligada à celulose. Ao que parece essa glicoproteína deve estar firmemente ligada à parede celular, pois sua extração

sô é possível mediante reagentes fortes. A natureza das ligações, bem como sua distribuição, geralmente variam de planta para planta.

LAMPORT¹⁷⁸ sugere uma possível relação entre a extensão de glicosilação de hidroxiprolina e a posição filogenética da planta.

Glicoproteínas do tipo hidroxiprolina-arabinose foram registradas em parede celular dos seguintes vegetais: Lycopersicon sculentum,¹⁷⁶ Acer pseudoplatanus,¹³⁵ Nicotiana tabacum,¹⁴⁵ Phaseolus coccineus,²²⁶ Apium graveolens,¹⁷⁴ Centaurea cyanus,¹⁷⁴ Rosa sp.,¹⁷⁴ Phaseolus vulgaris,^{54,55,56} Linum perenne,³² Oryza sativa,¹⁷⁴ Ginkgo biloba,¹⁷⁴ Solanum tuberosum,^{18,24,86,210} Pisum sativum,¹⁷⁴ Lupinus sp,²⁰¹ Chlamydomonas,²⁰⁰ e Datura stramonium.²⁴

A hidroxiprolina pode ligar-se a resíduos de β -arabinofuranose como, por exemplo, em lectinas de batata¹⁸ ou a resíduos de α -arabinofuranose, como ocorre na proteoglicana de arroz³¹⁵ ou a resíduos de galactopiranosídeo, como em arabino-galactanas^{109,278} ou em parede celular de Chlamydomonas.¹⁹⁹

A presença de hidroxiprolina foi constatada em parede celular de algas Chlorophyceae, inclusive em espécies inferiores como em Chlamydomonas e Chlorella, em algumas Cyanophyceae e em Bacillariophyceae (diatomáceas).^{177,227} Nesta última foi detectada uma dihidroxiprolina ligada à parede celular.²¹⁵

Apesar do teor relativamente baixo de hidroxiprolina encontrado em muitas algas, as proteoglicanas envolvidas desempenham papéis semelhantes àqueles de plantas superiores¹⁷⁴ ou de algas verdes.^{199,200,285}

Já em folhas de Cannabis sativa,^{141,142,143} de Urtica dioica,²⁰ em cápsulas de Papaver somniferum,¹⁴⁴ em folhas de Nicotiana tabacum,⁹ mucilagem de P. cruentum,¹⁵³ e Opuntia Ficus-indica,²²⁹ foram isoladas glicoproteínas do tipo serina-O-galactosídeo.

Devido as dificuldades de extração e purificação de material glicoproteico, ainda não foi identificada uma sequência completa dos seus aminoácidos e, sim, apenas fragmentos que mostram cerca de quatro resíduos de hidroxiprolil.¹⁷⁶

A lectina de batata,^{18,210} glicoproteína rica em hidroxiprolina e arabinose é semelhante à encontrada por LAMPORT.¹⁷⁶ Possivelmente essa glicoproteína atua como um sítio de reconhecimento para enzimas de hidroxilação, e glicosilação, através de uma diferente sequência de aminoácido.

ALLEN et al.¹⁸ propuseram que a lectina de batata pertence a um grupo de glicoproteínas vegetais solúveis que incluem precursores de extensina da parede celular.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ et al.¹⁰³ demonstraram que glicoproteínas ricas em hidroxiprolina podem atuar como agente de defesa contra patógenos vegetais. Estudando o alongamento celular em epicótilo de ervilha e hipocótilo de alface, observaram uma associação de proteínas ricas em hidroxiprolina com esse mecanismo, pois a maioria delas acumulava-se nas proximidades do corte realizado nesses tecidos.

CHRISPEELS et al.^{67,103} constataram que em cortes realizados em discos de cenoura aerados, a aeração aumentava a síntese e secreção de proteínas ricas em hidroxiprolina, sugerindo estar esse mecanismo relacionado com a reformulação estrutural da

parede ou talvez com a resistência à doença seguida de fermento. Observaram também que esse tipo de glicoproteína pode ser considerada uma provável precursora para a ligação covalente de proteínas da parede celular.

Uma arabinogalactana unida a uma proteína rica em hidroxiprolina foi isolada de Phaseolus vulgaris.¹¹⁷ A análise dos aminoácidos dessa arabinogalactoproteína mostrou que são ricos em hidroxiprolina e serina, semelhantes à extensina da parede celular²⁸⁰ e à lectina de batata.¹⁷ Assemelha-se ainda às proteínas citoplasmáticas ricas em hidroxiprolina isoladas por LAMPORT¹⁷⁷ e às glicoproteínas extracelulares isoladas por HORI & SATO.¹⁴⁵

As proteínas ricas em hidroxiprolina desempenham papéis importantes nos vegetais, como, por exemplo, na composição da estrutura da parede celular,^{174,179,285} em funções de reconhecimento¹² e de defesa contra processos infecciosos provocados por agentes patogênicos.^{103,104}

1.4 - RELAÇÃO HOSPEDEIRO-PATÓGENO

A relação hospedeiro-patógeno (bactéria ou fungo) pode ser traduzida pela habilidade com que o agente infeccioso produz enzimas capazes de degradar os polissacarídeos da parede celular do hospedeiro.¹⁰

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa que funciona como barreira à invasão de células estranhas. A passagem através da mesma por agentes patogênicos, pode ocorrer por meios mecânicos, por enzimas capazes de agir sobre os seus constituintes ou por uma combinação de meios físicos e enzimáticos.

É provável que a atuação de um conjunto de enzimas degradativas seja capaz de romper todas as ligações glicosídicas.^{10, 12} O sucesso com que uma infecção se instala no hospedeiro dependerá dessas enzimas. O estado infeccioso é, desse modo, traduzido através de interações que ocorrem entre as estruturas moleculares de ambos, patógeno e hospedeiro, a nível da superfície celular.

Alguns patógenos são altamente seletivos em relação ao hospedeiro, enquanto outros atacam grande número de espécies vegetais.¹²

A complexidade da natureza da relação hospedeiro-patógeno ainda não está de todo esclarecida, em particular no que se refere ao desenvolvimento de resistência. Constatou-se que esta relaciona-se com a concentração de hidroxiprolinas, de fitoalexinas,

de compostos fenólicos e com o aumento da atividade das enzimas que irão bloquear as necessidades nutritivas do parasita, impedindo ou dificultando a sua instalação.³¹¹

A maioria das infecções envolve tecidos parenquimáticos, que por sua vez são revestidos por células epidérmicas cujas paredes externas podem conter impregnações de cêra, cutina, suberina e lignina, que constituem também fatores de resistência, pois dificultam a penetração de agentes patogênicos. Em células lignificadas ou suberificadas a entrada do agente patogênico, geralmente, é feita através de espaços intercelulares ou de lesões já existentes na planta. Patógenos que não conseguem penetrar na planta através de superfícies intactas, vão infectá-la através de aberturas naturais, como, por exemplo, os estômatos.

Em parasitas obrigatórios a penetração no hospedeiro ocorre por meios mecânicos, através do estreitamento prévio das hifas com a subsequente formação dos haustórios. A ocorrência de alterações na composição da parede celular do hospedeiro, durante a infecção, é muito importante no que diz respeito ao mecanismo de resistência do mesmo. Em casos de parasitas facultativos, a penetração só é significativa quando envolve celulosas e hemicelulosas.

Quando substâncias fenólicas constituem respostas à infecção, é muito importante o papel desempenhado pela parede celular do hospedeiro. É o caso, por exemplo, da degradação da lamela média causada por definhamentos vasculares, mediante a ação de Verticillium sp. e de enzimas que atuam diminuindo o tamanho dos polímeros pectínicos. Como a susceptibilidade da planta hospedeira frente a essas enzimas varia de espécie para espécie, explica-se os diferentes tipos de resistências constatados em vegetais.³¹¹

Alterações na susceptibilidade da planta hospedeira podem

ser causadas pela presença de cálcio, cujos sais insolubilizam polímeros pectínicos. Substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como a auxina, também relacionam-se com a resistência, pois parecem apresentar as mesmas propriedades do íon cálcio.

HALL & WOOD¹²³ e MOUNT et al.²⁰⁸ observaram que as enzimas atuam diminuindo a permeabilidade do protoplasto, aumentando com isso a probabilidade de crescimento do patógeno e tornando os tecidos não infectados mais vulneráveis. Como o processo de degradação libera grande quantidade de energia, o patógeno a utiliza para aumentar a sua virulência.

ALBERSHEIM et al.¹⁰ sugeriram que a parede celular, bem como seus produtos de degradação, podem controlar a síntese das enzimas e afetar a resistência da planta. Esta hipótese baseia-se na complexidade da parede celular, no que concerne à variedade de polímeros homogêneos e heterogêneos e da presença ou não de ácidos urônicos. As enzimas degradativas atuam sobre os polissacarídeos da parede celular de acordo com suas especificidades.

Em toda relação hospedeiro-patógeno deve-se considerar¹⁰:

1º A habilidade com que os patógenos vegetais produzem enzimas hidrolíticas que vão degradar os polissacarídeos da parede celular. Nas plantas resistentes essas enzimas são incapazes de degradar tais polissacarídeos.

2º O controle do meio na produção de enzimas degradativas de polissacarídeos por patógenos vegetais. O que se pode perceber é que os carboidratos presentes no meio em que se encontra o patógeno vegetal regulam a produção das enzimas degradativas. Essas enzimas extracelulares são estáveis e quase sempre produzidas por indução. Seus indutores específicos parecem ser monossacarídeos simples.^{12,15} Por isso, qualquer mudança que ocorra na com-

posição, estrutura ou acessibilidade de carboidratos do hospedeiro, pode alterar quali e quantitativamente a secreção das enzimas pelo patógeno, constituindo um importante fator na determinação da susceptibilidade à degradação dos polímeros. Esse sítio é delimitado pelo próprio agente patogênico.

Quando ocorre mudanças na parede celular primária, a atuação das enzimas degradativas é alterada e com isso aumenta a proteção da planta hospedeira. Do mesmo modo, as mudanças que ocorrem durante a formação da parede celular secundária, inibem a habilidade das enzimas produzidas de degradar polímeros da parede celular do hospedeiro. Isso explica, por exemplo, os níveis relativamente altos de resistência constatados em partes velhas das plantas. Enzimas degradativas de polissacarídeos apresentam especificidades estritas à ligações glicosídicas de configuração α ou β e ao átomo de carbono envolvido na mesma.

Quando uma infecção se instala as enzimas degradativas de polissacarídeos e de substâncias pécnicas são detectadas já no início do processo. Em macerados de vegetais, por exemplo, as enzimas produzidas pelo fungo Sclerotinia fructigena foram a glicosidase endo-galacturonase e a liase. Em lesões de hipocótilo de feijão, causadas por Rhizoctonia solanii, VAN ETTEN et al.,²⁹¹ registraram endopoligalacturonase e uma celulase. Esses autores notaram, desde o início da infecção, a existência de enzimas que degradam xilanãs, galactanãs, galactomananãs, arabanãs, ácido poligalacturônico e carboximetilcelulose.

ENGLISH & ALBERSHEIM⁹⁹ observaram que certas enzimas são capazes de degradar todos os polissacarídeos isolados de parede celular de hospedeiro resistente. Os experimentos foram feitos com o fungo C. lindemuthianum, que secretava uma α -galactosidase

no meio de cultura, hidrolisando a galactose da parede celular da variedade susceptível de feijão, em cinco dias de cultivo. Em variedades resistentes de feijão houve pouca hidrólise, mesmo após dezoito dias de cultivo. Daí supôs-se que o regulador da virulência do patógeno e resistência do hospedeiro deve estar relacionado com o controle da produção de enzimas degradativas e não com a sua atividade.

Constatou-se, no entanto, que a endopoligalacturonase é a primeira enzima secretada pelo patógeno ao dar início à infecção em culturas de parede celular de Dicotyledoneae.^{11,99,154}

Entretanto, as paredes celulares de Dicotyledoneae tem associadas a elas proteínas capazes de inibir a ação das endopoligalacturonases secretadas por patógenos vegetais,^{108,154} não inibindo porém outras enzimas. Provavelmente, isso ocorre com todas as endopoligalacturonases envolvidas com a degradação de parede celular de Dicotyledoneae. Por exemplo, uma preparação protéica, purificada e homogênea de hipocótilo de feijão inibiu com a mesma eficiência as endopoligalacturonases secretadas por três fungos patogênicos: Colletotrichum lindemuthianum, Helminthosporium maydis e Aspergillus niger. Esse sistema inibidor de endopoligalacturonase, possivelmente, funciona como um mecanismo específico de resistência da planta hospedeira.¹²

Embora não tenha sido comprovada a existência de sistemas imunológicos em plantas, é provável que os antígenos da superfície dos patógenos sejam reconhecidos por proteínas de hospedeiros resistentes, resultando numa interação que ativa a defesa do hospedeiro.

Quando polissacarídeos de parede celular estão envolvidos no mecanismo de resistência de processos infecciosos, essas macromoléculas possuem estruturas específicas e a biossíntese de cada

uma delas deve ser controlada. Assim, o material de parede celular de várias partes morfológicas, como raízes, hipocótilos, primeiros nós e folhas primárias, tem composição característica de carboidratos, que é idêntica dentro de uma mesma espécie, mas que varia em espécies do mesmo gênero ou de gêneros diferentes.

Como já citado anteriormente, as respostas da planta à infecção podem ser traduzidas através da produção de fitoalexinas, de etileno,²⁸⁹ de enzimas lançadas à superfície do hospedeiro (quitinases, β 1,3-glucanases),^{1,71,118,148,230} de reações hipersensíveis, de mudanças no metabolismo do hospedeiro, de produção de inibidores de enzimas do patógeno, de processos de lignificação total, do aumento de compostos fenólicos e seus produtos de oxidação, que podem funcionar como inibidores de enzimas não específicas, em particular as pectolíticas.^{166,184,234}

A quitinase de tomates parece participar da lise de micélios de Verticillium album-atrum, que ocorrem durante a infecção por esse fungo.²³⁰

Por sua vez, os patógenos desenvolvem sua própria defesa contra a atividade lisolítica de enzimas de seus hospedeiros através de inibidores. Se estes tiverem capacidade suficiente para neutralizar todas as enzimas do hospedeiro que lhes sejam nocivas, a planta ficará sem esse mecanismo de defesa.

Entre os compostos fenólicos, o ácido cafêico desempenha um importante papel na defesa contra as larvas do bicho da seda (Bom-bix mori) e infecções por Streptococcus faecalis AD-4, constatado em folhas de amoreira.¹⁶⁸

Vários pesquisadores^{129,138,139,228} observaram a liberação de ácido ferrúlico, ácido diferrúlico (isômero trans) e p-cumárico de paredes celulares de Gramineae quando extraídas com álcali.

Em paredes celulares de Lolium multiflorum tratadas com celulase, contendo hemicelulases, verificou-se a liberação de uma série de ésteres de ácidos fenólicos com carboidratos, solúveis em água, inclusive ácido ferrúlico e p-cumárico.^{126,127}

WHITMORE³⁰² e UCHIYAMA et al.²⁹⁰ detectaram a presença de compostos fenólicos, possivelmente ácido ferrúlico, ligados a carboidratos (arabinose e xilose), ao que parece, na forma de ésteres. O mesmo tipo de composto foi identificado entre frações solúveis em água, extraídas de parede celular de arroz.²²⁸ Pequenas quantidades de ácido cafêico e p-cumárico, formando complexos com carboidratos, foram isoladas de parede celular de coleóptile de trigo.¹¹¹

MANIÑGAT & JULIANO¹⁹² obtiveram ácido ferrúlico por extração da parede celular do germe de arroz com solução aquosa a 0,6% de sulfato de dodecil sódico (SDS) em mercaptoetanol. Compostos fenólicos do tipo ácido ferrúlico foram ainda detectados em tecidos de calo de arroz, como uma resposta à infecção por fungos.²⁹⁰

O interesse do estudo dos compostos fenólicos prende-se ao fato dos mesmos estarem associados à resistência a processos infecciosos.

Conforme JOHNSON & SCHALL,¹⁵¹ estes compostos parecem estar envolvidos na resistência à infecção causada por Streptomyces scabies ou, segundo KUC,¹⁷² com a imunidade a vários fungos patogênicos. Batatas infectadas por Phytophthora infestans apresentaram maiores quantidades de ácido clorogênico nas variedades resistentes do que nas susceptíveis.¹⁵¹

Cumarinas e compostos fenólicos, formados em resposta à ferrugem de caule de trigo, desempenham um importante papel pelo seu efeito sobre o metabolismo do ácido indol-acético.²⁸²

NEWTON et al.²¹⁹, em experiências com trigo, também demonstraram a existência de correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a resistência à ferrugem. Da mesma forma, o ácido clorogênico parece desempenhar um papel na resistência de batata e cebola, frente a diferentes tipos de infecções.^{151,171}

A importância do ácido clorogênico deve-se mais à sua concentração em áreas localizadas, do que ao seu conteúdo total. Em batatas, por exemplo, a maior concentração foi encontrada próximo às lenticelas, que servem como porta de entrada para o parasita, e ao redor do tecido danificado. O mecanismo de proteção dado pelo ácido clorogênico, possivelmente, está acompanhado por outros simultâneos, pois, a tirosinase acumula-se no mesmo local e parece desempenhar igual função. Essa enzima, presente nos tecidos afetados, promove a oxidação do ácido clorogênico a quinonas, que parecem ser mais tóxicas aos agentes patogênicos. Assim, em variedades resistentes de batatas determinou-se uma maior proporção de quinonas em relação ao ácido clorogênico, do que em variedades susceptíveis.^{171,172}

A presença de altos níveis de ácido clorogênico foi ainda verificada em farinha e semente de girassol por SABIR et al.²⁴⁶ e, em luzerna, por NEWBY et al.,²¹⁸ onde detectaram que proteínas de baixo peso molecular e compostos fenólicos formam ligações do tipo amida, através de suas valências secundárias. Essa hipótese foi também sustentada por O'NEILL & SELVENDRAN.²²⁶

Também em parede celular de Lolium multiflorum, sob a ação de β -glicosidase, destacaram-se entre os produtos liberados, além de glucose, xilobiase, xilose e arabinose, ácido ferrúlico e ácido p-cumárico.¹²⁸ Possivelmente o ácido ferrúlico da parede celular é um precursor da lignina, pois, com o envelhecimento, a planta

em geral apresenta um maior conteúdo desse composto fenólico.¹²⁹ O teor em lignina parece ainda estar relacionada de maneira significativa com a diminuição da degradação de carboidratos da parede celular pela celulase. Isto explica a baixa digestibilidade de Gramineae altamente lignificadas fornecidas como alimentos a ruminantes.¹³⁰

A susceptibilidade de várias Gramineae (cevada, trigo e grama castellana) ao afídeo Metopolophium dirhodum, às bactérias, aos fungos e insetos varia em função da concentração de ácido hidroxâmico cíclico que é encontrado nas plantas. Altas concentrações desse ácido foram detectadas em sementes jovens, o que permitiu concluir-se que é nesse estágio de desenvolvimento que as plantas são mais susceptíveis ao ataque de agentes patogênicos. Assim, em cultivo de cereais, um controle natural da população de afídeos poderia ser obtido através da utilização de variedades com alta concentração de ácido hidroxâmico.²²

O fungo da ferrugem é um dos mais importantes agentes infecciosos de plantas. Devido a total dependência de seus hospedeiros é considerado um parasita obrigatório.¹⁸⁷

ALLEN¹⁶ foi quem registrou as primeiras experiências sobre inibidores da germinação de esporos do fungo da ferrugem, motivado pelos grandes prejuízos que a mesma causa à agricultura mundial.

Esses fungos, conhecidos por ferrugem devido à cor castanho avermelhada dos uredosporos, possuem um ciclo de vida complexo, no qual cinco diferentes tipos de esporos podem ser formados. Alguns deles completam seu ciclo em duas diferentes plantas hospedeiras, não relacionadas. É o caso, por exemplo, de Puccinia graminis, que além de atacar grammas e cereais, cresce também em espécies de Berberis.²⁵⁶

Os taninos também contribuem para a resistência, o que foi constatado através de experiências realizadas com carvalho e carapicho, infectados por Ceratocystis fagacearum.²⁴⁷

A inibição da atividade pectinolítica por substâncias fenólicas que ocorre, principalmente, por derivados de ácido cinâmico foi observada em raízes de Lycopersicon sculentum, quando infectadas por Colletotrichum coccodes e Pyrenochaeta lycopersici.⁸⁵

Em variedades de arroz susceptíveis à Cochliobolus myabeanus, observou-se o acúmulo de catecois oxidados e de outros fenóis tóxicos ao fungo durante o processo infeccioso, indicando que tais substâncias participam do mecanismo de defesa da planta.

Em cotilédones de Lactuca sativa infectados por Botrytis lactucae, ocorreu a morte rápida das células no local de penetração, bem como a produção de fitoalexinas.¹⁸⁸

Dois inibidores de uredosporos de ferrugem do trigo, Puccinia graminis, foram isolados e identificados como isômeros cis e trans de metil ferrulato, sendo o primeiro a forma ativa.¹⁸⁷

Em uredosporos desenvolvidos em feijão,¹⁸⁶ boca de leão e girassol,¹⁸⁷ foram isolados inibidores pertencentes ao metil-3,4-dimetoxicinamato, que estão sujeitos a variações sazonais que ocorrem dentro das espécies. Os diferentes fungos da ferrugem possuem ainda sensibilidades diferentes a um dado inibidor, caracterizadas por um alto grau de especificidade estrutural, intimamente relacionada com derivados de dihidroxicinamatos metilados, com grupos metil-ester e 3-metoxi. Observou-se que essa atividade inibitória desaparece quando o grupo carboxila do ácido cinâmico é convertido em função amida.²⁷²

A presença de fenoloxidasas tem sido relacionada com a resistência às infecções, atribuindo-se-lhes um importante papel na oxidação dos compostos fenólicos, originando as quinonas, tóxicas ao patógeno.^{140,214}

Experiências realizadas com cultivares de aveia demonstraram que o processo infeccioso causado por Helminthosporium victoriae estaciona nas variedades resistentes, devido provavelmente ao aparecimento de fitoalexinas. O mesmo não ocorre nas variedades susceptíveis, onde a infecção se alastra sem obstáculos.^{244,253}

As fitoalexinas são compostos do tipo flavonóide ou isoprenóide, de baixo peso molecular, resultantes de interações metabólicas entre o hospedeiro e o agente infeccioso.²⁶⁹ Elas estão presentes tanto em plantas saudáveis como em plantas infectadas, ocorrendo nestas em maiores concentrações. Geralmente, o aumento de sua concentração ocorre em resposta a estímulos fisiológicos ou a agentes infecciosos, porém, nunca em resposta a lesões mecânicas. Ocorrem sempre em maiores quantidades em cultivares resistentes.³⁶

Foi observado que a concentração de fitoalexinas depende do agente infeccioso, do cultivar da planta hospedeira e da fase da infecção. Verificou-se também que as células próximas da lesão são as mais vulneráveis ao ataque do patógeno, pois produzem menor concentração de fitoalexinas do que as células infectadas.^{81, 171,172}

Os patógenos podem ativar ou elicitar uma resposta hipersensitiva em seu hospedeiro através de moléculas próprias, chamadas eliciadores.

Em interações hospedeiro-patogeno também foi observado um

aumento da atividade da fenilalanina amonia liase, possivelmente relacionada com a produção de fitoalexinas. Já que essa enzima controla o fluxo de fenilalanina em direção a compostos fenólicos, ela possivelmente está envolvida, também, na produção de lignina e de outros compostos fenólicos relacionados com a resistência vegetal.¹²⁴

O papel das fitoalexinas na resistência ainda não está bem esclarecido, porquanto elas respondem de maneira não específica às infecções.

SEMPIO,²⁶⁰ em experiências com complexos trigo/Erysiphe, feijão/Uromyces, alface/Bremia e trigo/Puccinia, verificou que a relação fotossíntese/respiração varia em cultivares susceptíveis e resistentes. Ele demonstrou que plantas susceptíveis apresentam diminuição na atividade fotossintética e aumento na atividade respiratória, enquanto que as plantas resistentes apresentam ambas as atividades em níveis elevados.

Quando as folhas jovens de trigo foram infectadas pelo Botrytis cinerea, ocorreu como resposta a esse fenômeno um aumento no teor de lignina ao redor da lesão, precedido de um aumento das atividades enzimáticas de amônia liase e O-metil-transferase. O agente responsável por esse aumento é desconhecido.¹⁹⁴

A análise dos carboidratos da parede celular em cultivares susceptíveis e resistentes tem sido objeto de inúmeras pesquisas, no sentido de determinar suas diferenças e possíveis explicações dos fenômenos imunológicos.^{88,100,283}

Diversos tipos de alterações no conteúdo de carboidratos da parede celular foram observados em plantas infectadas. Essas alterações dependem da ação de diversas enzimas do tipo poliosídeos hidrolases e as variações mais significativas foram detecta-

das no conteúdo de arabinose e xilose da parede celular do hospedeiro susceptível.³⁵ Observou-se que quanto maior a virulência do patógeno, mais significativa é a alteração ocorrida no conteúdo de arabinose.²⁸³

Em degradação enzimática da madeira de Alnus rubra e Populus balsamifera, observou-se que o conteúdo em carboidratos diminuiu mais rapidamente do que o teor em lignina, sendo portanto uma hidrólise dirigida à celulose e hemicelulose. Em Pinus, no entanto, a lignina constitui um maior impedimento à degradação de carboidratos.¹⁰⁰

Foi observado que nos órgãos infectados, geralmente, o primeiro composto degradado pelos fungos é a glucose, seguida de galactose e xilose, ao que parece, devido à ação da celulose.³⁴

As hemiceluloses possivelmente constituem a principal fonte de carbono para o fungo em madeira, pois através das hemiceluloses e glicosidases, ocorre sua despolimerização e transformação em produtos metabolizáveis.

Quando hemiceluloses da madeira foram usadas como substrato de enzimas extracelulares de Coriolus versicolor e Poria placentula, ocorreu, inicialmente, uma clivagem ao acaso pelas hemiceluloses, resultando monossacarídeos no final do processo.¹³⁷ Entretanto, quando esses polissacarídeos foram isolados do caule de cicuta, observou-se que aquelas mesmas enzimas degradavam mais a hemicelulose A, constituída predominantemente de xilanas, do que a B, formada por heteropolissacarídeos.¹³⁷

Na interação hospedeiro-patógeno de uma variedade de melão infectada por Colletotrichum lagenarium foi registrada um aumento no teor de hidroxiprolina da parede celular do hospedeiro susceptível, supondo-se ser essa ocorrência a primeira resposta da planta à infecção.^{72,104} Esse aumento foi verificado também em trigo,

quando infectado por Erysiphe graminis, em casos de plantas infectadas por fungos,^{72,104} em viroses,¹⁶⁵ e ainda quando a malformina era aplicada à planta hospedeira.⁵⁹

ESQUERRE-TUGAYÉ^{101,104} trabalhando com o mesmo sistema hospedeiro-patógeno citado acima, observou um aumento de hidroxiprolina na parede celular do epicótilo e pecíolo infectado. Porém, quando usou sementes de melão infectadas pelo mesmo fungo, o aumento de hidroxiprolina foi 10 vezes maior do que naqueles órgãos. Foi verificado também um aumento concomitante no teor de arabinose, indicando uma elevação no conteúdo de extensina da parede celular. Em plantas infectadas não ocorre um aumento de prolina citoplasmática, que após hidroxilação são transferidas pela glicosil-transferase à parede celular, e sim um aumento do conteúdo de extensina. O mecanismo pelo qual esse aumento ocorre é desconhecido.¹⁰²

A quantificação de hidroxiprolina em plantas infectadas tem sido difícil, pois geralmente uma parte da mesma é degradada durante o processo extrativo. Todavia, ao que parece, numa mesma família, o teor e as características moleculares da hidroxiprolina são contantes.

Segundo DIAS et al.⁸⁸ folhas infectadas, quando expostas ao sol, além de apresentarem um maior número de lesões produzidas por uredosporos de H. vastatrix, demonstraram conter um menor teor de carboidratos do que folhas infectadas mantidas à sombra.

De uredosporos da ferrugem do cafeeiro foram isoladas duas enzimas, pectinase e celulase, que provavelmente, junto com as hemicelulases, hidrolizam polissacarídeos da parede celular durante o processo infeccioso.¹⁹⁵

Os inibidores da ferrugem cafeeira provavelmente pertencem ao grupo dos derivados de ácido cinâmico.^{242,272} Em folhas de ca-

cafeeiro resistentes à Ceratocystis fimbriata foram observados inibidores de igual natureza química.³¹⁶

Em folhas de cafeeiro resistentes inoculadas com H. vastatrix, observou-se maior atividade das polifenoxidasas.²¹⁴ É provável que o ácido clorogênico em cafeeiro funcione como substrato para fenoloxidasas responsáveis pelo escurecimento de tecidos vegetais lesados.

O teor de ácido clorogênico no cafeeiro varia de espécie para espécie ou dentro de uma mesma espécie.¹⁹ Em sementes verdes de café o seu teor varia de 5 a 8% e na variedade Mundo Novo foi detectado 7,1%. Verificou-se que esse teor aumenta com a maturação da semente, porém diminui com a germinação.²⁹⁶ Em experiências realizadas com folhas de cafeeiro, susceptíveis e resistentes à ferrugem, constatou-se que a quantidade de ácido clorogênico era menor naquelas.²¹⁴

Enquanto o fator de resistência à ferrugem nas espécies Coffea canephora e Coffea liberica é atribuído ao ácido clorogênico existentes na casca,⁹⁶ na seleção Bourbon, de Coffea arabica, sua natureza é desconhecida.⁶⁴ Em plantas imunes (Coffea canephora e Coffea liberica) à Ceratocystis fimbriata foi encontrado um teor altamente significativo de polifenóis totais em relação às plantas susceptíveis (Típica, Bourbon e Caturra) a esse fungo.³¹⁶

Segundo ZULUAGA et al,^{316,317} a resistência acha-se associada a um maior teor de ácidos fenólicos, enquanto que, a susceptibilidade a um maior teor de compostos do tipo flavonóide. Na caracterização deste último detectou-se um núcleo de quercetina ligado a um monômero ou polímero de açúcar.

ECHANDI & FERNÁNDEZ⁹⁶ observaram um aumento na resistência apresentada pelo cafeeiro à Ceratocystis fimbriata, quando na planta ocorria um aumento do nível de ácidos fenólicos do tipo clorogênico, cafêico, ferrúlico e p-cumárico.

A propagação da infecção está relacionada também com a presença de glucosamina, existente na parede celular do patógeno, cujo teor pode dar idéia da sua virulência.^{103,288}

Outros mecanismos de defesa da planta à infecção podem ser representados, ainda, por enzimas existentes na parede celular do hospedeiro, como, por exemplo, peroxidases, invertases ácidas, B-galactosidases e ribonucleases.

1.5 - A HEMILEIA VASTATRIX Berk et Br.

As lesões causadas em folhas de cafeeiro pela H.vastatrix são conhecidas no Brasil como ferrugem ou ferrugem alaranjada. Além dela, existe outra, conhecida por ferrugem farinhosa ou pulverulenta, que é provocada pela Hemileia coffeicola Maubl. et Roger, até agora registrada apenas em países africanos.^{66,238}

A origem da ferrugem cafeeira é muito controvertida. Certos autores consideram que surgiu na Etiópia ou Uganda, provavelmente em tempos pré-históricos. Outros, acreditam-na ser originária da África Central. Todavia, o primeiro registro bibliográfico sobre a ocorrência da doença, data de 1861, e relata sua existência em cafeeiros silvestres na província de Nyanza, no Quênia.^{52,66,238}

Sob o aspecto botânico, o agente causador da ferrugem alaranjada possui o seguinte enquadramento taxonômico:

Divisão: Fungi

Classe: Basidiomycetes

Sub-classe: Phragmobasidiomycetidae

Ordem: Uredinales (Pucciniales)

Família: Pucciniaceae

Tribo: Hemileiae

Gênero: Hemileia

Espécie: Hemileia vastatrix Berk et Br. ⁹⁸

A ferrugem foi constatada no Brasil, pela primeira vez, pelo fitopatologista ARNALDO MEDEIROS, na Fazenda Assunção, Município de Aureliano Leal, no Estado da Bahia.^{52,243}

Ela ataca praticamente todas as espécies conhecidas do gênero Coffea, tendo sido constatado que a C. arabica é das mais susceptíveis. Esta espécie é a que encontra-se mais difundida no Brasil.

A propagação da ferrugem é causada pelo homem, pelas chuvas e, mais raramente, pelos ventos e insetos. Ela ataca de preferência as folhas e, muito esporadicamente, os frutos e as extremidades dos ramos jovens.⁴²

O esporo ou uredosporo, ao atingir a epiderme abaxial da folha, exige condições favoráveis de umidade e temperatura para germinar e infectar a planta. Sua penetração dá-se através dos estômatos. As primeiras lesões aparecem após 7 a 12 dias da infecção, ocorrendo a esporulação após 15 a 20 dias. Em cada pústula da ferrugem estima-se que se desenvolvem cerca de 150.000 uredosporos. As hifas de infecção crescem em direção ao tecido paliçádico, fixando-se aí e transformando o conteúdo celular em densa massa granulada, de coloração amarelo-pálida, com 1 a 3 mm de diâmetro, com um aspecto ligeiramente oleoso quando observada por transparência. (Figs. 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4). Em poucos dias tornam-se amarelo-alaranjadas e pulverulentas, podendo cobrir grande extensão do limbo. Em folhas velhas, o centro da lesão apresenta-se muitas vezes necrosado. A pulverulência amarelo-alaranjada é constituída por esporos do patógeno e é o único sinal externo da enfermidade. Em cultivares resistentes as manchas são menos desenvolvidas.^{180,242} (Fig.6)

Do ciclo de vida da H. vastatrix, no cafeeiro, só se conhecem as fases uredosporos, teliosporos e basidiosporos, não tendo-se constatado a formação de aeciosporos e picnosporos, que ocorrem na ferrugem do trigo, por exemplo.²⁵¹

Os uredosporos são geralmente unicelulares, reniformes, piramidais, com uma face plana e as outras convexas (Fig. 7).

O controle químico da ferrugem foi feito pela primeira vez no Ceilão, por MARSHALL WARD, usando sulfeto de sódio. Posteriormente desenvolveram-se fungicidas cúpricos, que, apesar de mais eficientes e econômicos, só possuem efeito preventivo.^{52,243,284}

Melhores resultados no controle da ferrugem tem sido alcançados por geneticistas, desenvolvendo cultivares resistentes. Nesse sentido, destacam-se os trabalhos do Departamento de Genética, do Instituto Agrônomo de Campinas, onde foram desenvolvidos os híbridos Catu, por cruzamento de C. arabica com C. robusta, e Catimor, por cruzamento de C. arabica com C. canephora, ambos imunes ao fungo.^{65,243,2}

Como este trabalho objetiva o esclarecimento da ação enzimática apenas da H. vastatrix em folhas de cafeeiro, no seu desenvolvimento o termo ferrugem será utilizado para identificar esse parasitismo específico.

1.6 - PROPOSIÇÃO

Entre os polissacarídeos que compõe a parede celular das folhas do cafeeiro, as hemiceluloses A e B, desempenham importante papel estrutural e são consideradas o substrato mais disponível para o desenvolvimento do fungo da ferrugem.

A hemicelulose A é predominantemente uma 4-0-metil-glucuro-

noxilana e foi estudada por WENZEL & CORREA.²⁹⁸

Quanto à hemicelulose B, inexistem estudos esclarecedores sobre sua composição química e estrutural.

Visando o preenchimento, ao menos em parte, dessa lacuna, é que se desenvolveu o presente trabalho, que tem por objetivos específicos:

- esclarecer alguns aspectos estruturais e de composição química de 10 frações de hemicelulose B de folhas de cafeeiro, susceptíveis (SUS) e resistentes (RE) à ferrugem;
- estudar a ação enzimática da H. vastatrix sobre as hemiceluloses de folhas de cafeeiro; e,
- caracterizar uma peptidoglicana e alguns compostos fenólicos isolados nos processos de extração e fracionamento.

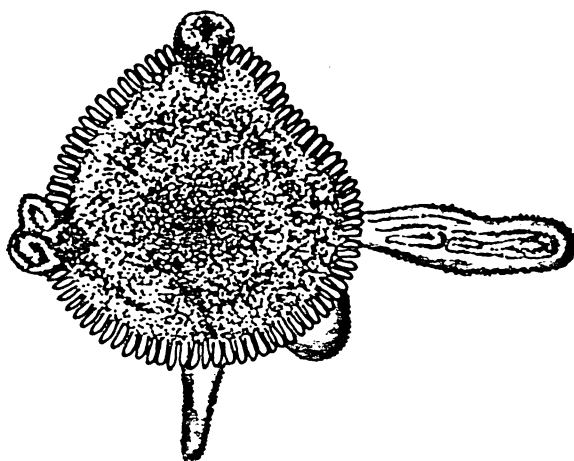


Fig. 5.1 - Uredosporos de H. vastatrix com 5 tubos germinativos. Equinulações da parede em destaque. (x 700).⁶⁶

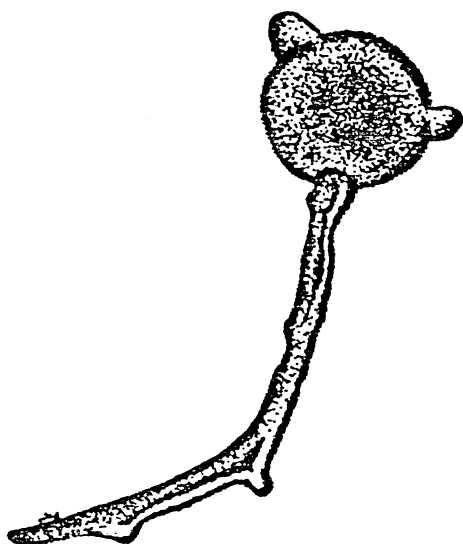


Fig. 5.2 - Tubo germinativo em desenvolvimento. (x 300).⁶⁶

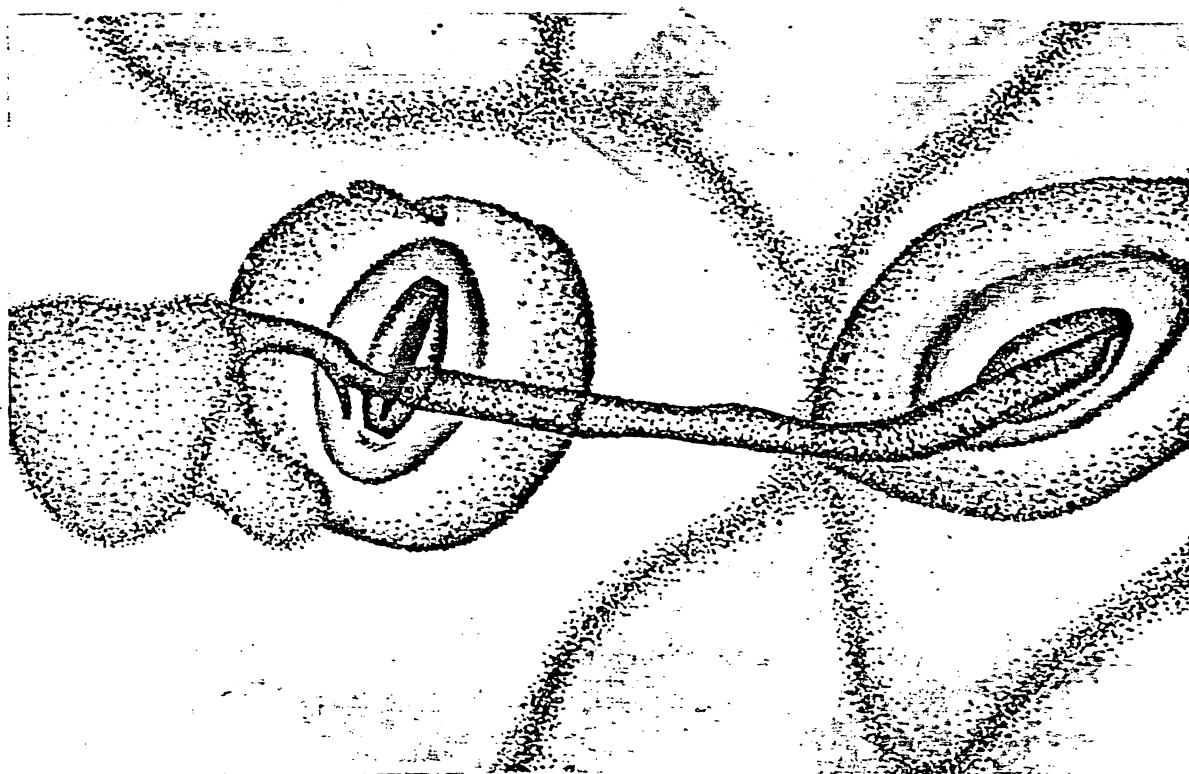
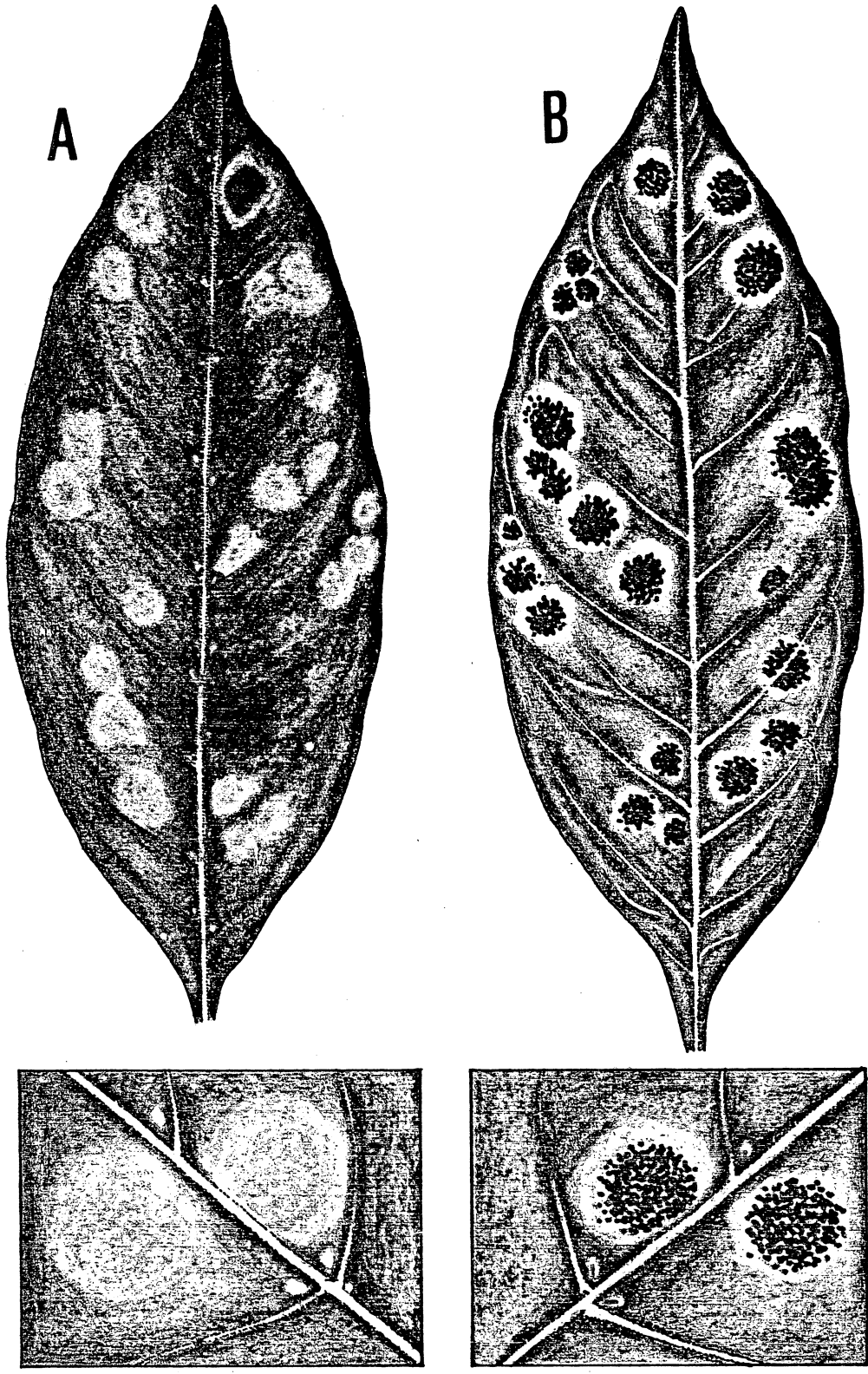


Fig. 5.3 - Tubo germinativo de uredosporo sobre o estômato da folha, em início do processo de penetração.⁶⁶



Fig. 5.4. - Corte transversal de folha de C. arabica L., mostrando micélio e haustórios da H. vastatrix nos tecidos e a câmara sub-estomatal tomada por fascículos. Observa-se também esporóforos e uredosporos super-estomatais.⁶⁶



(2,5 x)

Fig. 6 - Folha de cafeeiro atacada pela ferrugem: face superior (A) e face inferior (B).⁴²

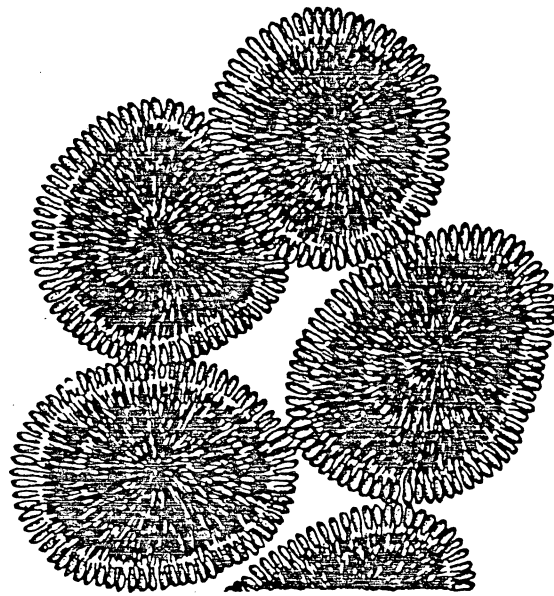


Fig. 7 - Uredosporos de H. vastatrix. (550 x).⁶⁶

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - MATERIAL

As folhas de Coffea arabica L. var. Mundo Novo, susceptíveis foram coletadas na Fazenda das Areias, Município de Boa Esperança, Minas Gerais, no mês de julho. As de cultivar resistente, de especificidade genética SH₄, foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas, também coletadas em julho.

Os reagentes químicos utilizados possuíam as seguintes procedências e especificidades:

Etanol, éter etílico e acetona, usados na extração, eram da Ecibra, "técnica".

Ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose e D-glucose, padrões, do Man Research Laboratories (USA), "pró-análise".

Ácido tricloroacético, amido solúvel, glicerol, metaperiodato de sódio, iodeto de metila, dimetil sulfato, cloreto de D-galactosamina, cloreto de D-glucosamina, cloreto de D-manosamina, cetavlon (N-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromid) e piridina, da Merck alemã, "pró-análise".

Albumina bovina, da Sigma (USA).

Blue dextran, da Pharmacia Fine Chemicals (Suécia).

Acetato de celulose (Cellologel, da Chemetron (Itália)).

Azul de Procion M-3G, da Cia. Imperial de Ind.Quim.do Brasil.

ECNSS-M e OV-225 em Gás Chrom Q para g.l.c., da Supelco (USA).

Os demais reagentes químicos utilizados apresentavam especificidade "pró-análise".

2.2 - MÉTODOS

2.2.1 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO

As folhas, após a colheita, foram inicialmente despigmentadas com etanol absoluto (3 x) e acetona (1 x), e dessecadas ao ar. Em seguida, submetidas ao moinho Wiley (40-60 mesh). Os pós obtidos, 374 g da SUS e 80 g da RE, foram extraídos em Soxhlet, primeiro com uma mistura em partes iguais de metanol e clorofórmio, durante 72 h. e depois, com acetona, durante 24 h. Essas extrações livraram o material de pigmentos, lipídios, ceras e compostos fenólicos fracamente ligados. Os extratos foram descartados. O material, após nova dessecação, foi extraído com água a 80°C, durante 2 h. (3 x 1 l), filtrado a vácuo através de funil de Büchner, usando-se um tecido de algodão. Os filtrados reunidos foram tratados com etanol (3 vol.) dando um precipitado que foi recuperado por centrifugação. Após secagem a vácuo obteve-se o material péptico P-I (SUS = 47,52 g e RE = 10,20 g). O resíduo da extração com água quente foi então extraído com solução aquosa de oxalato de amônio e ácido oxálico (0,25% de cada), a 80-85°C, durante 1 h. (3 x) e filtrado a vácuo através de funil de Büchner e tecido de algodão. O filtrado (3,8 l) foi dialisado contra água corrente e tratado com etanol (3 vol.), obtendo-se o material péptico P-II (SUS = 7,07 g e RE = 1,50 g). O resíduo proveniente dos tratamentos e extrações prévias, foi extraído com uma solução aquosa de KOH a 4%, contendo 0,5% de boroidreto de sódio (2 x, 1 litro cada

vez), durante 72 h, e fluxo contínuo de nitrogênio.^{47,48,299} O extrato alcalino foi filtrado a vácuo através de Büchner, com tecido de algodão, e o resíduo lavado várias vezes com água destilada. Os filtrados combinados foram resfriados com gelo e ajustados a pH 5 com ácido acético a 50%, obtendo-se um precipitado (hemicelulose A) que foi separado por centrifugação e um sobrenadante (hemicelulose B). Após dessalicificação por diálise e precipitações etanólicas e secagem, foram obtidas as frações de hemiceluloses A(4) (SUS = 9,12 g e RE = 1,90 g) e B(4) (SUS = 11,38 g e RE = 2,46 g). O resíduo proveniente da extração com KOH a 4% foi extraído com solução de KOH a 24%, durante 72 h., em fluxo contínuo de nitrogênio, à temperatura ambiente.^{159,202} Os extratos e águas de lavagens combinados foram acidificados com ácido acético a pH 5 e as hemiceluloses A(24) (SUS = 14,31 g e RE = 2,81 g) e B(24) (SUS = 16,23 e RE = 5,10 g), foram obtidas como o descrito para as hemiceluloses A(4) e B(4). Fig. 8. A seguir, as hemiceluloses B(24) (SUS, 5,14 g e RE, 4,07 g) foram suspensas em água destilada e desproteinizadas (12 x) pelo método de SEVAG, modificado por STAUB.²⁷⁴

2.2.2 - MÉTODO DE FRACIONAMENTO

As hemiceluloses B(24) desproteinizadas foram dissolvidas em cloreto de cálcio 3,7 M, sob agitação magnética durante 19 h. e tratadas com solução iodo-iodetada, de acordo com o método de GAILLARD,^{112,114,115,116} obtendo-se um precipitado (polissacarídeo mais linear) e um sobrenadante (polissacarídeo mais ramificado). O precipitado, após separação por centrifugação, foi suspenso em água quente com agitação magnética durante 24 h. Em seguida, tratado com tiosulfato de sódio e centrifugado (30', 3.000 r.p.m.), separando-se um precipi-

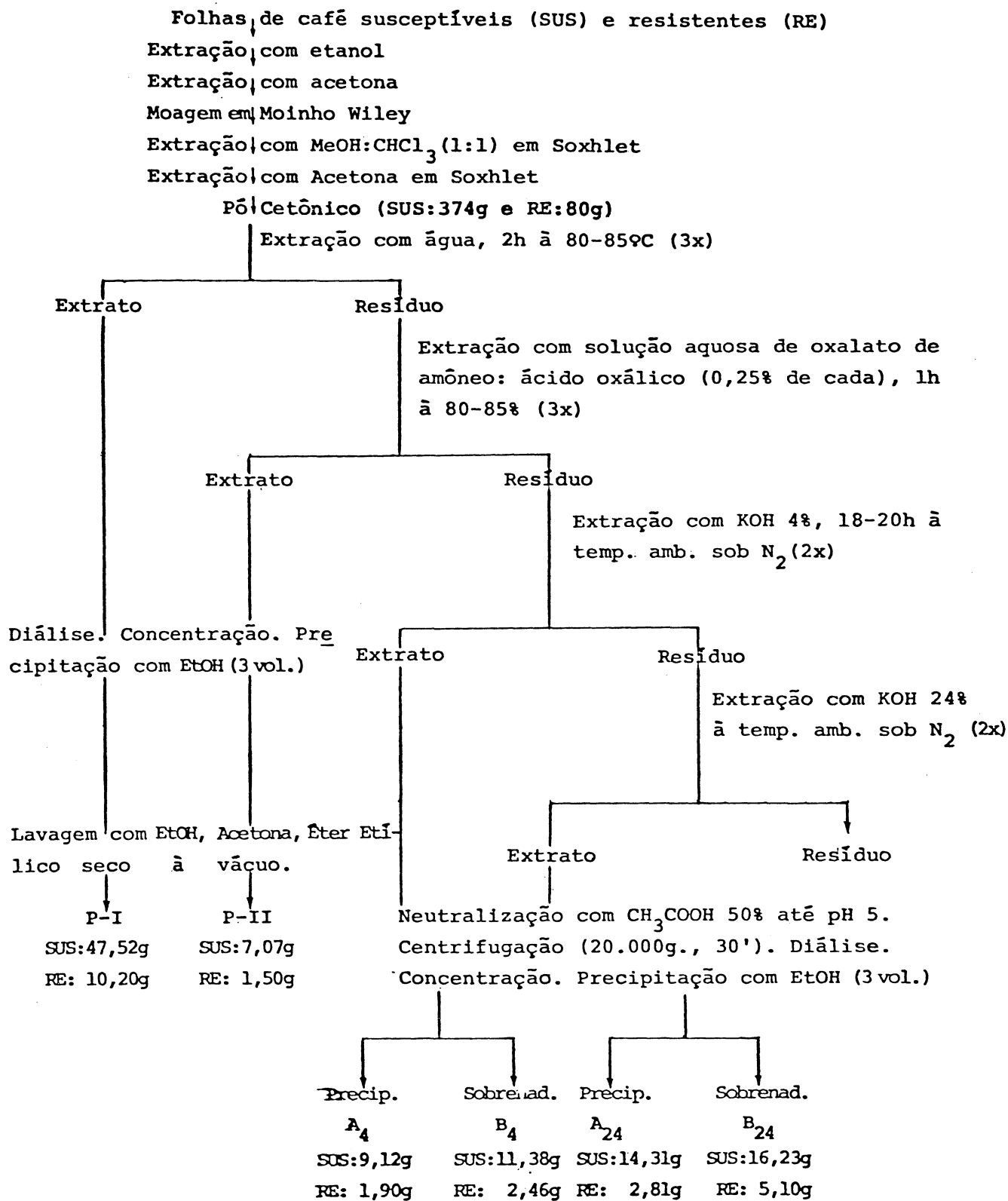


Fig. 8 - Fracionamento dos polissacarídeos da Parede Celular de folhas de cafeeiro.

Hemicelulose B 24 (SUS: 5,14g.; RE:4,07g)

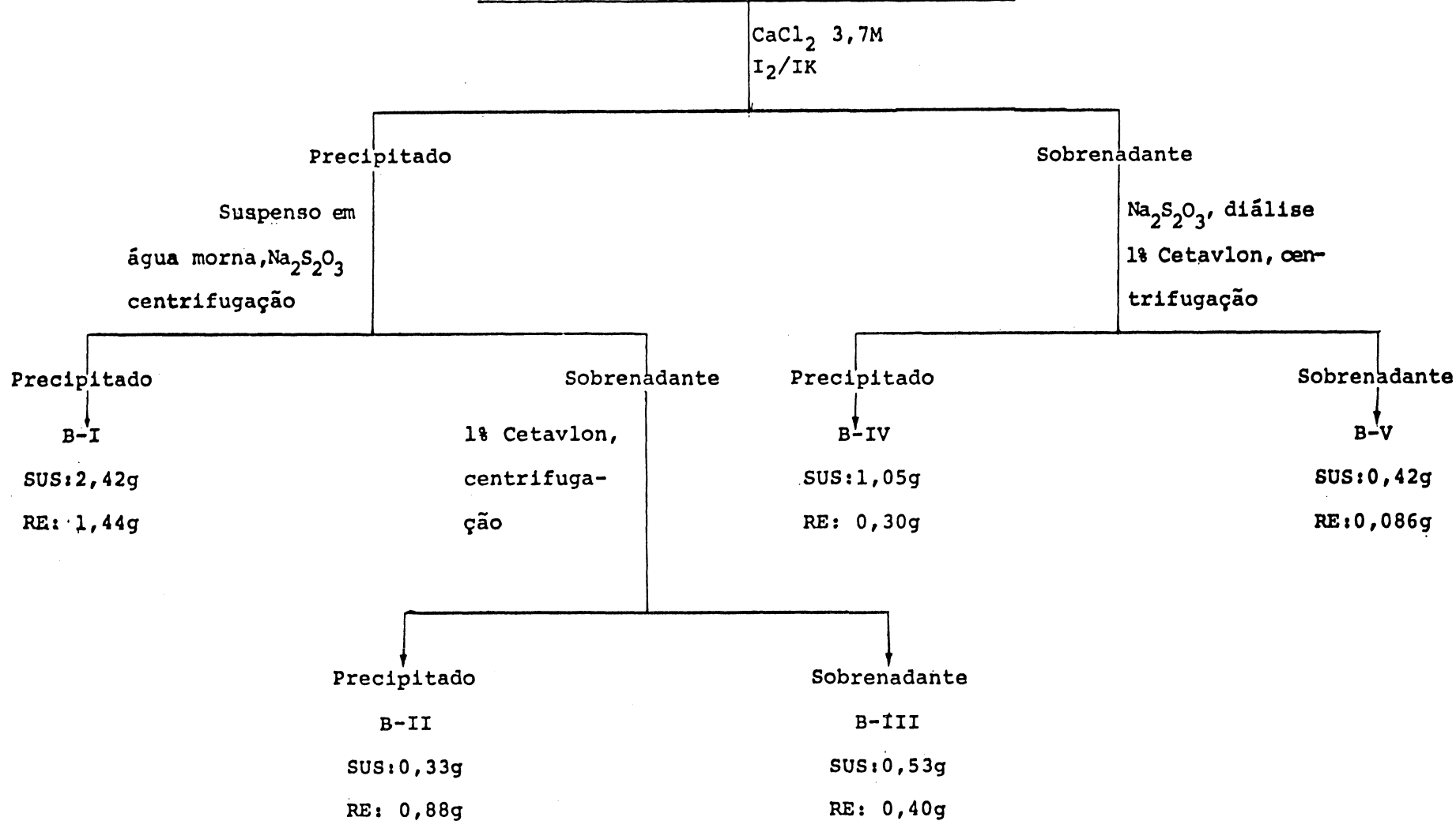


Fig. 9 - Fracionamento das Hemiceluloses B₂₄

tado (B-I) e um sobrenadante. Este foi precipitado com solução aquosa a 1% de cetavlon. Após centrifugação obteve-se as frações polissacarídicas B-II e B-III. O sobrenadante, após novo tratamento com tiosulfato de sódio e diálise em água corrente por 12 hs., foi precipitado com solução aquosa de cetavlon, fornecendo, por centrifugação, as frações polissacarídicas B-IV e B-V (Fig. 9).

Dessa forma, foram obtidas 5 frações hemicelulósicas do cultivar SUS e 5 frações do cultivar RE, que foram codificadas como B-I, B-II, B-III, B-IV e B-V, cujos rendimentos constam da Tabela I.

Como os métodos de extração e de fracionamento das hemiceluloses foram repetidos, pôde-se observar a boa reprodutibilidade dos mesmos.

2.2.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

2.2.3.1 - ELETROFORESE

A homogeneidade das frações polissacarídicas foi verificada através de eletroforese, em fitas de acetato de celulose (CELLOGEL), após coloração das amostras com Azul de Procion M-3G, pelo método de DUDMAN & BISHOP.⁹⁴ O experimento foi realizado em aparelho Fanem, 250-350 V, 2,5 mA por fita, 10 minutos, com câmara de imersão da Chametron e tampão borato 0,2 M, pH 9,2.

2.2.3.2 - POLARIMETRIA

As rotações óticas foram determinadas em polarímetro Perkin Elmer, modelo 141, a 25°C, a partir de soluções aquosas a 0,5% de polissacarídeo, com a raia D de sódio e caminho ótico de 0,1 dm.

2.2.3.3 - ESPECTROFOTOMETRIA

2.2.3.3.1 - REGIÃO VISÍVEL

Em aparelho Coleman Jr., mod. 6A, e em espectrofotômetro de duplo feixe DB da Bechman Inst. Co.

2.2.3.3.2 - REGIÃO DO INFRA-VERMELHO

Em aparelho Bechman Inst. Co., mod. Acculab^R 10. As pastilhas foram feitas com 200 mg de brometo de potássio e 3 a 5 mg de polissacarídeo, e foram obtidas em prensas (Carver Lab. Press, mod. C-Fred S. Carver Inc.), sob vácuo e pressão de 19.000 psi. Também foram feitos filmes do material em solução clorofórmica em célula de NaCl. Essas análises foram feitas para acompanhar os ensaios de metilação, até que não mais houvesse bandas de absorção em 3.400-3.600 cm^{-1} e também para a identificação do composto fenólico, usando-se um padrão autêntico de ácido clorogênico.³⁷

2.2.3.3.3 - REGIÃO DO ULTRA-VIOLETA

Em aparelho UV-VIS Varian, mod. 635, para compostos fenólicos.

2.2.3.3.4 - RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA PROTÔNICA

Em aparelho Varian XI-100-15, para compostos fenólicos, isolados por cromatografia preparativa e analisados por g.l.c. As soluções do composto fenólico foram preparadas a 20% em D_2O , à temperatura ambiente, com padrão externo de tetrametilsilano.

2.2.3.4 - ÍNDICE DE pH

As determinações de pH foram efetuadas em aparelho Clamann & Graimert MV 85.

2.2.3.5 - EVAPORAÇÕES

Foram realizadas a vácuo, à temperatura de 30-40°C, com exceção dos metanolizados das frações metiladas, que foram evaporadas à temperatura ambiente.

2.2.3.6 - ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

A cromatografia em papel (c.p.) foi realizada em papel Whatman números 1 e 3 MM, pelo método de desenvolvimento ascendente e descendente, nos seguintes sistemas de solventes:

Ascendente: a) benzeno:n-butanol:piridina:água (1:5:3:3, v/v, fase superior); b) acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (18:3:1:4, v/v, fase superior); c) acetato de etila:ácido acético:água (9:2:2, v/v); d) acetato de etila:piridina:ácido acético:água (5:5:1:3, v/v).

Descendente: h) n-butanol:piridina:água (5:4:3, v/v, fase superior).

Os cromatogramas foram revelados com nitrato de prata alcalino.^{147,287}

As análises cromatográficas em camada delgada (t.l.c.) foram realizadas em placas de sílica gel 60, de 20 x 20 cm, com 0,25 mm de espessura, empregando os seguintes sistemas de solventes: e) n-butanol:ácido acético:água (6:2:2, v/v); f) fenol:água (3:1, v/v); g) acetato de etila:eter de petróleo:clorofórmio (3:3:1, v/v).

A visualização foi feita com solução de ninhidrina (0,1% em acetona, p/v),⁸⁷ e ácido sulfúrico a 5% em metanol (v/v).

Nas análises por cromatografia gasosa (g.l.c.) foi utilizado um cromatógrafo Varian mod 2.440, com detector de ionização de

chama, e nitrogênio como gás de arraste e velocidade de deslocamento da carta de 20 cm/h. As colunas utilizadas foram: Coluna A: 3% de ECNSS-M sobre GÁS CHROM Q de 100-120 mesh, em tubo de aço inox de 200 X 0,15 cm (d.i.), com detector de chama a 250°C, câmara de injeção de 230°C e fluxo de gás de arraste de 60 ml/min. Foram empregadas temperaturas de 190°C para análise de acetatos de alditóis de açúcares, conforme SAWARDEKER et al.^{252,275} e 170°C para acetatos de alditóis parcialmente metilados, segundo LINDBERG.¹⁸² Coluna B: 3% de OV-225 sobre GÁS CHROM Q de 100-120 mesh, em tubo de aço inox de 200 x 0,15 cm (d.i.), com detector a 250°C, câmara de injeção a 230°C e fluxo de gás de arraste de 60 ml/min. Foram empregadas temperaturas de 170°C para os derivados parcialmente metilados de acetatos de alditóis, segundo LINDBERG,¹⁸² e 190°C para acetatos de alditóis de açúcares, conforme SAWARDEKER et al.^{252,275}

A percentagem relativa dos derivados analisados por g.l.c. foi determinada pelo processo de triangulação.²⁵²

Os tempos de retenção (T) relativos dos produtos parcialmente metilados e acetilados foram calculados em relação ao 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol, e para os derivados de alditóis acetatos os valores de T foram calculados em relação a uma mistura de padrões acetilados conhecidos.

A cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) foi realizada em coluna capilar de 25 m de comprimento, empacotada com OV-225. A programação da temperatura usada foi de 50°C até 180°C, aumentando 40°C por minuto até a temperatura máxima e varredura de 40 a 420 cada segundo a 70 elétron/volt. Usou-se 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil glucitol, como padrão interno. A fragmentação de massa obtida da análise de cada pico foi comparada com os valo-

res citados na literatura.^{44,45,150}

Os derivados parcialmente metilados procedentes das frações hemicelulósicas (SUS e RE), bem como os compostos fenólicos isolados por cromatografia preparativa, foram analisados em g.l.c. e GC-MS, na forma de acetatos de alditóis.

2.2.3.7 - DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS

As determinações de carboidrato total foram realizadas pelo método de DUBOIS et al.,⁹³ usando-se um solução de D-xilose (40 µg/ml) como padrão.

Ácidos urônicos foram determinados pelo método de BITTER & MUIR,⁴³ usando-se o ácido D-glucurônico como padrão.

Açúcares redutores foram analisados pelo método de SOMOGYI & NELSON,^{216,267} usando D-glucose como padrão (1 µg/ml).

Hexosaminas foram determinadas pela reação de ELSON-MORGAN, modificada por BLIX,⁹⁰ e também pela reação de BOAS,⁵⁰ usando-se como padrão uma solução de 2-amino-2-deoxi-D-galactose (2,25 µg/ml).

Proteínas foram ensaiadas pelo método de LOWRY et al.,¹⁸⁵ usando-se soro de albumina bovina como padrão (20 mg%).

Nitrogênio total foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl.¹⁵⁷

O-acetil foi determinado pelo método de HEXTRIN, modificado por DOWNS et al.,⁹² usando-se glucose hexa-acetato como padrão (3 µg/ml).

Fósforo foi determinado pelo método de BARTLETT,³⁹ usando-se o fosfato monobásico de sódio como padrão (36,2 µg/ml).

Sulfato foi ensaiado pelo método da benzidina, segundo ANTONOPOULOS,²¹ usando-se sulfato de sódio anidro como padrão (22,5 µg/ml).

2.2.3,8 - HIDRÓLISE ÁCIDA

As hidrólises ácidas parciais e totais foram realizadas nas seguintes condições:

Hidrólise parcial - As frações polissacarídicas foram tratadas com ácido sulfúrico 0,05 N, em tubo selado, com aquecimento em banho maria a 80°C, durante 4,30 h., segundo ADAMS.⁴ A solução foi resfriada a 0°C em banho de gelo e o precipitado insolúvel foi separado por centrifugação e descartado. Ao sobrenadante foi acrescentado etanol até obtenção de uma solução com uma concentração de 85%. Como houve formação de um precipitado e de um sobrenadante, submeteu-se a nova centrifugação. Em seguida, tanto o sobrenadante quanto o precipitado obtidos, foram evaporados até secura. Os resíduos foram novamente hidrolisados com ácido sulfúrico 0,1 N, durante 5 h., em banho de água fervente.

Hidrólise total - Foram utilizadas diferentes técnicas de conformidade com o componente em análise:

- Com ácido sulfúrico 1 N. Realizada em banho de água fervente, durante 5 h., em ampolas seladas. Em seguida, neutralizadas com carbonato de bário e centrifugadas para a remoção do sulfato de bário formado. O sobrenadante foi deionizado com resina Dowex 50 W X-8 f.H⁺ (200-400 mesh). Usada para descartar interferentes insolúveis e dosear só os carboidratos totais.

- Com ácido sulfúrico a 72% (v/v). Realizada à temperatura ambiente, durante 2 h., seguindo-se diluição a 8% e refluxo a 100°C, durante 5 h. Neutralização com carbonato de bário e centrifugação. A solução sobrenadante foi deionizada com resina Dowex 50 W X-8 f.H⁺ (200-400 mesh). Para determinação de carboidratos totais e caracterização de compostos fenólicos.²⁵⁹

- Com ácido trifluoroacético (TFA) 1 N. Realizada em banho de água fervente, durante 5 h., em ampolas seladas. Em seguida, o ácido foi eliminado por evaporação a vácuo, até securo; seguiram-se sucessivas evaporações com pequenas quantidades de água destilada (3 x). Para determinação de carboidratos totais.

- Com ácido clorídrico 4 N. Realizada em banho de água fervente, durante 6 h., em ampolas seladas. O excesso de ácido foi eliminado por evaporação a vácuo, até securo, adicionando-se em seguida água destilada (3 x) e evaporando-se novamente até securo.³⁰⁹ Para determinação de hexosaminas.

Com ácido clorídrico 6 N. Realizada em estufa a 100°C, durante 24 h., em ampolas seladas. O excesso de ácido foi eliminado por evaporação a vácuo, até securo, e removido totalmente através de sucessivas evaporações com pequenas quantidades de água destilada (4 x). Para determinação qualitativa de aminoácidos.

- Com ácido clorídrico concentrado, contendo 50% de ácido propiônico. O tratamento foi feito em ampolas seladas, a vácuo, em banho de água fervente, durante 1 h. O precipitado formado foi separado por centrifugação e descartado. O sobrenadante foi evaporado até securo e submetido a sucessivas evaporações com pequenas quantidades de água destilada (3 x), para remover o excesso de ácido. Utilizada para a determinação qualitativa de aminoácido, principalmente de triptofano.

2.2.3.9 - REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS

Os monossacarídeos resultantes das hidrólises ácidas foram reduzidos com boroidreto de sódio à temperatura ambiente, durante 8 h. Após deionização com resina Dowex 50 W X-8 f.H⁺ (200-400 mesh) e remoção do ácido bórico por repetidas evaporações com metanol (5 ml, 3 x), os alditóis resultantes foram acetilados com anidrido acético (2 ml) e piridina (2 ml), segundo WOLFROM & THOMPSON.³¹⁰

2.2.4 - MÉTODOS ANALÍTICOS ESPECIAIS

2.2.4.1 - DETERMINAÇÃO RELATIVA DOS MONOSSACARÍDEOS NEUTROS

Amostras (10 mg) das diferentes frações polissacarídicas foram submetidas à hidrólise ácida total com ácido sulfúrico 1 N ou com TFA 1 N (2 ml), e os hidrolisados foram analisado por c.p., solvente a. Em seguida, os produtos de hidrólise foram analisados por g.l.c., na forma de acetatos de alditóis (colunas A e B), como indicado na Tabela II. Ainda entre os produtos de hidrólise foi detectado um composto fenólico, analisado como segue: Os hidrolisados reduzidos e acetilados foram cromatografados por t.l.c. preparativa, solvente g, localizando-se as manchas por observação sob lâmpada UV. O componente fluorescente, com Rf 0,57, foi removido da placa, solubilizado em clorofórmio, filtrado e analisado por g.l.c. (coluna A) e por GC-MS, comparando-se com um padrão autêntico de ácido clorogênico, tratado e analisado em idênticas condições (Tabela II). Os derivados acetilados do componente fenólico e

do ácido clorogênico foram posteriormente analisados por espectrometria de N.M.R.¹H e por espectrofotometria I.V. e U.V.

2.2.4.2 - ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS

As frações polissacarídicas (20 mg) foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6 N e analisadas por t.l.c. em cromatografia monodimensional, solventes e e f. Os produtos de hidrólise foram também analisados em cromatografia bidimensional, usando-se os mesmos solventes. A revelação foi executada com solução de ninhidrina a 0,1% em acetona.⁸⁷

Paralelamente, foi feita uma hidrólise total com ácido clorídrico e propiônico, a fim de evitar-se a quebra de moléculas de aminoácidos. Os hidrolisados foram cromatografados em t.l.c., solvente e e visualizados com solução de ninhidrina a 0,1% em acetona.

As análises quali e quantitativas de aminoácidos foram também efetuadas em um analisador automático de aminoácidos, na Escola Paulista de Medicina, após hidrólise das frações com ácido clorídrico 6 N, contendo 0,5% de fenol, a vácuo, a 110°C, durante 72 h. Os valores médios das análises feitas em duplicata no analisador automático de aminoácidos, encontram-se na Tabela IV.

2.2.4.3 - FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHAROSE

As frações polissacarídicas SUS (25 mg) foram solubilizadas em tampão tris-HCl 25 mM (pH 7,2) e aplicadas a uma coluna de sepharose 6B (2 x 38,5 cm), a qual foi eluída com o mesmo tampão, com uma velocidade de fluxo de 1,25 ml/h.^{23,69} Foram coletados eluatos de

2 ml, em um coletor de frações, onde foram dosados carboidratos totais pelo método do Fenol-ácido sulfúrico e proteínas totais pelo método de LOWRY. A coluna foi previamente calibrada com Blue Dextran (P.M. = 2.000.000). Os valores de densidade ótica foram graficados versus volume (Fig. 13).

2.2.4.4 - ISOLAMENTO, METILAÇÃO E ANÁLISE DOS ÁCIDOS ALDO-BIURÔNICOS

As frações polissacarídicas (50 mg) foram hidrolizadas com TFA 1 N e os produtos de hidrólise foram concentrados e aplicados a uma coluna (2 x 15 cm) de resina AG1-X 10 (AcO⁻) (200-400 mesh). A coluna foi lavada com água para remover os açúcares neutros e, em seguida, com ácido acético a 30% para eluição dos componentes acídicos. Após concentração até secura para remoção do ácido, o resíduo foi redissolvido em água (1 ml) e analisado por c.p., revelando componentes com R_{xil} 0,64 e 0,30 (solvente c) e R_{xil} 0,42 e 0,08 (solvente b). Após cromatografia preparativa em papel e subsequente eluição, o componente com R_{xil} 0,64 foi convertido em metil ester metilglicosídeo, por tratamento com metanol contendo 3% de gás clorídrico (2 ml), a refluxo, durante 8 h e reduzido com boroidreto de sódio. Seguiu-se uma deionização e hidrólise com TFA 0,5 N, durante 5 h., a 100°C e o hidrolisado foi analisado por g.l.c. na forma de acetato de alditóis, buscando a presença de pentose, de hexose e de hexose parcialmente metilada.

Paralelamente, a mistura de oligossacarídeos ácidos de cada fração hemicelulósica foi carboxi-reduzida como acima descrito e analisada por g.l.c. na forma de acetato de alditóis (Tabela III).

Os ácidos aldobiurônicos (5 mg), após metilação de HAKOMORI,¹²⁵ foram carboxi-reduzidos com boroidreto de sódio em metanol, novamente metilados, hidrolisados e analisados por g.l.c. (coluna B), na forma de acetatos de alditóis, parcialmente metilados.⁴⁶

2,2,4,5 - ANÁLISES POR METILAÇÃO

As análises por metilação foram efetuadas pelos métodos de HAWORTH e de HAKOMORI.

Método de HAWORTH:¹³² Às frações hemicelulósicas (20 mg), dessecadas sob pentóxido de fósforo, foram adicionados boroidreto de sódio (10 mg) e hidróxido de sódio a 45% (3 ml) e as soluções agitadas durante 4 h., sob nitrogênio, até completa solubilização. Em seguida, adicionou-se acetona (1 ml) e sulfato de dimetila (1,2 ml). A adição deste último reagente, gota a gota, durou 4 h., no final da qual a mistura foi agitada por mais 12 h. Todo esse tratamento foi conduzido à temperatura ambiente. A neutralização dos reagentes metilantes foi realizada com ácido sulfúrico 5 M, gota a gota, em banho de gelo, adicionando-se uma gota de fenoltaleína, para controle do ponto de viragem. As frações parcialmente metiladas foram dialisadas em água corrente durante 24 h. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes para cada fração.

Método de HAKOMORI:^{25,125} As frações polissacarídicas parcialmente metiladas foram submetidas à permétilação, segundo HAKOMORI, modificado por SANDFORD & CONRAD.²⁵⁰ O método consiste na formação de um alcóxido do polissacarídeo pela adição de metil-sulfínil carbanion, antes da adição do agente metilante, iodeto de metila.^{70,77,82} Inicialmente, as frações polissacarídicas parcialmente metiladas foram dessecadas sob pentóxido de fósforo e, a seguir, colocadas em um balão de Claisen de três bocas, equipado com

termômetro, condensador e rolha de borracha, por onde foram introduzidos 2 ml de dimetilsulfôxido, sob fluxo contínuo de nitrogênio. Esse sistema foi deixado sob agitação, em temperatura ambiente, durante 12 h., para solubilização das frações polissacarídicas.

Em seguida, adicionou-se anion metil-sulfinil (0,00046 equivalentes) com agitação magnética, sob nitrogênio, durante 12 h. Após a formação do alcóxido, as soluções foram resfriadas a 20°C, em banho de água, e os polissacarídeos foram metilados com iodeto de metila (0,4 ml), gota a gota, sob agitação, não permitindo que a temperatura ultrapassasse 25°C. A mistura reagente foi dialisada em água corrente por 12 h. e os produtos metilados foram extraídos várias vezes com clorofórmio, secados com sulfato de sódio anidro e evaporados até a secura. O espectro de infra-vermelho dos polissacarídeos metilados não mostrou bandas de absorção em 3.400-3.600 cm^{-1} , indicando a ausência de grupos hidroxilas, confirmando estarem as frações polissacarídicas totalmente metiladas.

2.2.4.6 - HIDRÓLISE, REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO METILADO

As frações polissacarídicas metiladas (7 ml) foram pré-hidrolisadas com ácido fórmico a 85%, em banho de água fervente, durante 2 h. A mistura foi resfriada e concentrada, sob pressão reduzida, até a obtenção de um xarope que foi hidrolisado com ácido sulfúrico 0,25 M, em banho de água fervente, durante 14 h. Os hidrolisados foram neutralizados com carbonato de bário e analisados na forma de acetatos de alditóis, parcialmente metilados, por g.l.c. (colunas A e B) e por GC-MS, como indicado na Tabela V, e, ainda, por t.l.c. (solvente g).^{46,275} Fig. 28.2.

2.2.4.7 - DEGRADAÇÃO TIPO SMITH

As frações hemicelulósicas (50 mg) foram oxidadas pelo metaperiodato de sódio (15 ml) na ausência de luz, a 49°C, durante 120 h. O excesso de periodato foi decomposto com etilenoglicol (2 ml) e os reagentes foram então removidos por diálise. Os produtos foram reduzidos com boroidreto de sódio, durante 12 h., à temperatura ambiente e dialisados. Após cada oxidação e redução os produtos degradados foram hidrolisados com ácido clorídrico 0,5 N, à temperatura ambiente, durante 8 h., concentrados até secura para remoção do ácido e dialisados em água destilada sob agitação magnética. A cada etapa de oxidação os materiais foram concentrados e os processos de oxidação, diálise e redução, foram repetidos por mais duas vezes. Os produtos dialisáveis e os não dialisáveis foram, em seguida, concentrados e hidrolisados com TFA 1 N, a 100°C, durante 5 h. e analisados por g.l.c. (coluna B) e por t.l.c. (solvente g), na forma de acetato de alditóis.^{2,25,95,119,131,273} Tabelas VI e VII. Fig. 28-1.

2.2.4.8 - HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO B-I (SUS)

O polissacarídeo (0,5 g) foi hidrolisado com TFA 0,5N, por 2 h., a 100°C, e o precipitado formado foi removido por centrifugação. O sobrenadante foi concentrado até a secura para remover o ácido residual, redissolvido em água (2 ml) e aplicado a uma coluna de 3,5 x 22 cm de carvão celite (1:1). O material foi eluído primeiro com água (1 l) e então com soluções etanólicas aquosas de 5, 10, 15, 30 e 50% (v/v, 1 litro cada vez). Foram coletadas frações de 50 ml e analisados os carboidratos totais, açúcares redutores e proteínas. Uma porção de cada um desses eluatos foi

hidrolisado com ácido clorídrico 6 N e analisado para aminoácidos em t.l.c. (solventes e e f). Fig.15. Outra porção foi hidrolisada com TFA 1 N, a 100°C, durante 5 h. e os produtos analisados por g.l.c. (coluna B), na forma de acetato de alditóis, Tabela VIII.

2.2.4.9 - HIDRÓLISE ALCALINA DA FRAÇÃO B-I (SUS)

O polissacarídeo (50 mg) foi tratado com uma solução aquosa saturada de hidróxido de bário (5 ml), à refluxo, durante 15 h. Após a neutralização da solução com ácido sulfúrico 1 N e filtração, o filtrado foi evaporado até a secura. O resíduo foi dissolvido em solução de ácido acético 0,1 N (2 ml) e aplicado a uma coluna de 1 x 32 cm de Bio Gel P-2 (200-400 mesh), o qual foi eluído com a mesma solução. As frações (2 ml) foram analisadas para carboidrato total pelo método do fenol-ácido sulfúrico e para proteínas totais pelo método de LOWRY. Os aminoácidos foram analisados por t.l.c., solvente e. Fig. 16. Os eluatos reunidos foram dissolvidos em NaOH 5 N (1 ml) contendo boroidreto de sódio e mantidos a 100°C, durante 5 h. Em seguida, adicionou-se 9 ml de água destilada para diluir o álcali e a mistura foi dessalificada por extração, primeiro com etanol e depois com piridina. Parte do eluato foi analisado para aminoácido em t.l.c. (solvente e), Fig. 17. Outra parte foi cromatografada em c.p. (solvente a), Fig. 18, bem como por g.l.c., na forma de acetato de alditóis (coluna A). Os eluatos 6 e 7 foram misturados, reduzidos com boroidreto de sódio, acetilados e analisados por espectrofotometria de UV e IV.

2.2.4.10 - AÇÃO DAS ENZIMAS EXTRA E INTRACELULARES

Os uredosporos de H. vastatrix, portadores do fator "V5" de virulência, foram coletados de pústulas de folhas de C. arabica, variedade Mundo Novo, fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas. Com auxílio de microscópio, foram verificados, previamente, se esses esporos recebidos não possuíam contaminações por Verticillium hemileiae, parasita da ferrugem, ou por bactérias, através da técnica de coloração de Gram ou por Azul de algodão 0,05% em lactofenol.⁸⁹ Os esporos contaminados foram rejeitados.

Preparo do extrato de enzimas extracelulares - Os extratos foram obtidos por meio de lavagens dos esporos (1,42 g) com solução tampão de acetato de sódio 0,025 M (6 ml) e pH 5,5, sob agitação branda, durante 10 minutos, e separados em centrífuga refrigerada. A integridade dos esporos foi observada microscópicamente indicando que não houve ruptura dos mesmos durante as lavagens. Posteriormente, o extrato foi filtrado através de uma seringa com filtro "Millipore" com membrana de 0,02 µm e o precipitado foi transferido para um gral de porcelana em gelo. O sobrenadante, contendo as enzimas extracelulares (6 ml), foi dialisado em água destilada a 4°C, durante 24 h.

Preparo do extrato de enzimas intracelulares - Após a extração das enzimas extracelulares, os esporos foram recebidos em um gral de porcelana, em gelo, e macerados em óxido de alumínio e solução tampão de acetato de sódio 0,025 M, pH 5,5. Este tratamento intermitente de congelamento, maceração e descongelamento, foi repetido 8 vezes. A seguir, foram centrifugados em centrífuga refrigerada, a 9.800 r.p.m., durante 15 minutos. O sobrenadante (11 ml) (enzimas intracelulares) foi dialisado a 4°C, durante 18 h., 3 vezes.⁴⁰

Ação das enzimas - A atividade das enzimas extra e intracelulares foi medida por incubação das mesmas ($300 \mu\text{l} = 3 \mu\text{g}$), a 40°C , solubilizadas em acetato de sódio $0,25 \text{ M}$ e $\text{pH } 5,5$, com as frações hemicelulósicas SUS e RE ($300\mu\text{l} = 6 \text{ mg}$), solubilizadas em acetato de sódio $0,5 \text{ M}$ e $\text{pH } 5,5$, nos seguintes tempos: 0, 6, 20, 28 e 44 h. Nos produtos da hidrólise dosou-se o açúcar redutor pelo método de SOMOGYI-NELSON. Os valores de μg de glucose foram graficados versus tempo de incubação, conforme indicado nas Figs. 24 e 25. Os produtos de hidrólise correspondentes ao tempo de incubação de 20 h., foram analisados por c.p. descendente (solvente h) e visualizados com solução de nitrato de prata alcalina (Figs. 20 a 23). Os produtos de hidrólise correspondente ao tempo de incubação de 28 h., foram analisados por g.l.c., na forma de acetato de alditóis (coluna B). Tabelas IX e X e Fig. 26. Nessas análises foram usados padrões de L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glucose e ácido D-glucurônico, e os valores obtidos foram repetitivos nas experiências realizadas.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

As hemiceluloses B, contidas na fração ainda não purificada (B-24), após desproteínização pelo método de SEVAG²⁷⁴ (12 x), apresentaram além da reação de LOWRY positiva, também um grande número de aminoácidos, constatados por t.l.c., sugerindo a presença de proteínas ligadas a polissacarídeos (peptidoglicanas). Este fato também foi observado por HENDERSON & HAY,¹³⁶ em experiências com folhas de Berberis vulgaris.

O fracionamento das hemiceluloses B, de ambos os cultivares, pelo método de GAILLARD, separou as frações polissacarídicas mais lineares ou levemente ramificadas que se complexaram com o iodo na presença de íon cálcio, das frações polissacarídicas altamente ramificadas. Além disso, pela análise dos derivados metilados, observou-se que unidades de D-glucose e de D-xilose, encontram-se unidas por uma ligação do tipo 1 → 4, concordando com GAILLARD et al.^{112,114,115,116} de que a formação do complexo com o iodo só ocorre quando num polímero de açúcar houver uma seqüência de, no mínimo, 3 unidades desses monossacarídeos, ligados 1 → 4.

A propriedade que tem os sais de amônio quaternário de precipitarem os polissacarídeos ácidos em meio levemente alcalino, foi utilizada para a obtenção das frações hemicelulósicas ácidas B-I (SUS e RE), B-II (SUS e RE) e B-IV (SUS e RE) e as frações hemicelu-

lósicas neutras B-III (SUS e RE) e B-V (SUS e RE). A utilização do sal de amônio quaternário, cetavlon, permitiu a obtenção de frações hemicelulósicas bem homogêneas, o que contribuiu para a precisão dos experimentos analíticos realizados.^{38,254,255}

Embora inesperado, as 4 frações hemicelulósicas esperadas "neutras", apresentaram valores variáveis de ácido urônico, porém em quantidade significativamente inferior ao das frações ácidas (Tabela I).

As frações polissacarídicas obtidas apresentaram uma elevada complexibilidade estrutural, conforme se observa na Tabela II. Basicamente constituem-se de galactoglucoarabinosilanas (B-I, SUS e RE), arabinoglucoxilanas (B-II, SUS e RE), arabinosiloglucanas (B-III, SUS e RE e B-V, SUS), glucoarabinosilanas (B-IV, SUS e RE) e arabinogalactosiloglucanas (B-V, RE). Como a eletroforese em acetato de celulose, segundo DUDMAN & BISHOP,⁹⁴ mostrou uma única banda para cada fração, é provável que se trate de heteropolissacarídeos complexos.

Devido a forte pigmentação escura da maioria das frações, a rotação ótica específica só pôde ser determinada em B-III e B-V, SUS e RE, incolores. Enquanto a fração B-III apresentou valores de rotações óticas relativamente próximos para os cultivares SUS e RE, $[\alpha]_D^{25} = +46^\circ$ e $[\alpha]_D^{25} = +48,1^\circ$, respectivamente, os cultivares da fração B-V apresentaram rotações óticas acentuadamente diferentes $[\alpha]_D^{25} = +41,7^\circ$ e $[\alpha]_D^{25} = +23,6^\circ$. Isto demonstrou que somente a fração B-V, SUS e RE, são diferentes tanto no que se refere à composição em monossacarídeos, como na rotação ótica (Tabelas I e II). Estes valores de rotação ótica assemelham-se aos de hemiceluloses isoladas de outras fontes.^{6,159,160,162,205,206,264,266,295.}

TABELA I

Propriedades e composição química das frações hemicelulósicas.

	B-I		B-II		B-III		B-IV		B-V	
	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE
Rendimento (%)	47.1	35.4	6.4	21.6	10.3	9.8	20.4	7.4	8.2	2.1
Carboidrato total (%)*	48.0	40.5	40.0	58.0	56.5	54.0	30.5	37.5	51.0	21.0
Ácido urônico (%)**	8.5	15.5	9.0	7.0	4.0	3.5	15.0	14.5	6.0	5.2
Hexosamina (%)***	4.0	0.0	4.5	0.0	5.0	0.0	9.0	0.0	6.0	n.d.
Proteínas (%)	5.5	8.5	6.0	6.5	0.0	1.5	0.5	5.5	1.0	1.2
Nitrogênio total (%)	0.5	0.6	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	n.d.	0.4	n.d.
$[\alpha]_D^{25}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+46.0	+48.1	n.d.	n.d.	+41.7	+23.6
Fosfato	0.02	0.0	0.001	0.0	0.074	0.0	0.25	n.d.	0.074	n.d.
Sulfato	0.02	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05	n.d.	0.0	n.d.

* Determinado pelo método do fenol-sulfúrico;

** Método carbazol e os valores calculados como % de ácido glucurônico sobre açúcar total.

*** Método de BLIX e reação de BOAS e os valores calculados como % de galactosamina sobre açúcar total.

n.d. = não determinado.

TABELA II
 Hidrolisados das frações hemicelulósicas,
 analisados como acetato de alditóis por g.l.c.

	Proporção relativa (%)*									
	B-I		B-II		B-III		B-IV		B-V	
	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE
L-ramnose	5.30	2.00	4.60	0.0	0.0	0.0	3.40	0.0	0.0	3.00
L-arabinose	24.55	28.33	24.22	30.00	7.78	9.19	32.50	31.77	15.00	18.00
D-xilose	41.10	38.90	36.04	34.60	39.70	33.70	36.27	40.61	33.48	23.77
D-manose	tr	tr	1.20	0.0	1.50	0.96	0.50	0.0	1.80	1.60
D-galactose	10.30	12.30	4.70	2.73	4.30	5.35	3.20	5.80	5.90	20.90
D-glucose	17.23	17.91	29.19	32.22	46.71	50.79	24.07	21.58	42.98	31.78
Ác. 4-O-Me-glucurônico	6,50	9.60	6.50	4.60	2.00	2.10	10.50	11.50	3.70	n.d.
Ác. glucurônico	2.00	5.70	2.50	2.30	2.00	1.20	4.20	3.20	2.40	n.d.
Composto fenólico	2.00	3.00	3.00	5.30	1.50	0.80	2.80	2.50	2.60	2.50

* Área dos picos dado por g.l.c., em colunas A e B, a 190°C
 n.d. = não determinado.
 tr = traços.

Todas as frações apresentaram uma banda de absorção no espectro de infra-vermelho em 887 cm^{-1} , indicando que, provavelmente as unidades de D-glucose encontram-se em configuração β . Assim, as frações B-III e B-V, de ambos os cultivares, assemelham-se estruturalmente às xiloglucanas já estudadas.^{159,160,162,163,205.}

Como a extração das frações hemicelulósicas de cafeeiro, de sicamore, de jojoba, de Leguminosae e de Gramineae, só é possível usando-se solução aquosa de KOH a 24%, é provável que suas moléculas estejam fortemente ligadas a microfibrilas de celulose através de interação xilose-glucose. A utilização de solução aquosa de KOH a 4% não foi suficiente para a extração desses polissacarídeos em quantidades apreciáveis.

As frações hemicelulósicas ácidas apresentaram uma maior proporção de ácidos urônicos do que as neutras, conforme demonstra a Tabela I. Esses compostos foram identificados por cromatografia em papel e gasosa⁴⁶ como sendo ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-D-glucurônico. Os oligossacarídeos ácidos, após hidrólise parcial e separação em coluna de AG1-X 10 (AcO^-), foram carboxi-reduzidos, analisados e identificados por g.l.c. na forma de acetato de alditóis como ramnose, arabinose, xilose, 4-O-metil-glucose, glucose e ácido cafêico, este em grande proporção. Isto demonstra a presença de ligações de ácidos urônicos não só com xilose, mas também com ramnose e arabinose (Tabela III). Os ácidos aldobiurônicos, carboxi-reduzidos e permetilados pelo método de HAKOMORI,¹²⁵ foram analisados por g.l.c., na forma de acetato de alditóis, constatando-se a presença de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucose, 3-O-metil-D-xilose, 2,3-di-O-metil-L-arabinose e 3,4-di-O-metil-L-ramnose. Por esses resultados conclui-se que os ácidos D-glucurônico e 4-O-metil-D-glucurônico, acham-se provavelmente ligados em C-2 da xilose, em C-4 da arabinose e em C-2 da ramnose, confirman-

TABELA III

Composição dos ácidos aldobiurônicos resultantes da hidrólise dos polissacarídeos com TFA 1 N, 100°C, 5 hs e separados em coluna de resina AG1-X 10 (AcO⁻).

	Proporção relativa (%) [*]									
	B-I		B-II		B-III		B-IV		B-V	
	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE
L-ramnose	22.0	28.9	27.5	36.0	27.0	27.1	28.5	17.3	23.1	n.d.
L-arabinose	5.4	4.5	3.6	4.3	8.3	5.7	4.3	10.5	6.3	n.d.
D-xilose	32.0	38.5	4.5	29.5	11.4	25.7	4.0	65.5	9.0	n.d.
4-O-Me-Glucose	30.2	17.7	45.7	19.7	26.6	26.3	44.7	5.1	37.0	n.d.
D-glucose	10.1	10.4	18.7	10.3	26.6	15.0	18.5	1.4	24.4	n.d.
Compostos fenólicos	12.0	32.0	54.0	17.8	82.4	53.0	50.2	2.3	62.3	n.d.

* Área dos picos dado por g.l.c., em colunas B, a 170°C.

n.d. = não determinado.

do resultados anteriormente obtidos.³⁰⁷

Uma variação significativa na relação xilose:ácido urônico, foi observada na fração B-I (SUS e RE). É provável que essa fração hemicelulósica constitua um dos substratos para o desenvolvimento do fungo da ferrugem, visto que foi ativamente hidrolisada. Figs. 24 e 25.

A presença simultânea dos ácidos 4-**O**-metil-D-glucurônico e D-glucurônico foi constatada em xilana de Gramineae,^{30,106,307} bem como na hemicelulose A de folhas de cafeeiro.^{297,298.}

Os teores de nitrogênio total determinados pelo método de micro-Kjeldhal, Tabela I, foram inferiores aos encontrados por WENZEL²⁹⁸ e por WENZEL & CORREA²⁹⁷ para as hemiceluloses A e B de folhas de cafeeiro. Isto se deve, provavelmente, aos diferentes métodos de extração (KOH a 15%, 6 h.) e de fracionamento utilizados. Os autores^{297,298} justificam esses valores como procedentes somente de proteínas, porém hoje sabe-se que o conteúdo de nitrogênio total nas frações hemicelulósicas susceptíveis procedem não só de proteínas como também de aminoaçúcares.

As frações hemicelulósicas, quando submetidas à hidrólise com HCl 6 N, apresentaram aminoácidos que variaram quali e quantitativamente de uma fração para outra, conforme indica a Tabela IV. Pode-se notar que as frações B-I, B-II e B-IV (ácidas), contém um maior teor protéico do que as B-III e B-V (neutras) e os aminoácidos predominantes nas diversas frações foram principalmente ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, glicina, prolina, e hidroxiprolina. O conteúdo em hidroxiprolina nas frações B-I (SUS) e B-V (SUS) foi bastante significativo, porém como paralelamente não houve um aumento e sim uma diminuição no conteúdo de arabinose nessas frações (Tabela II), e as folhas de cafeeiro

TABELA IV
Aminoácidos das frações hemicelulósicas

Aminoácidos	Mol %									
	B-I		B-II		B-III		B-IV		B-V	
	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE
Lys	2.2	2.7	1.8	3.5	1.0	1.0	2.0	2.5	1.3	n.d.
His	1.1	3.8	1.0	2.1	*	*	1.0	1.4	*	n.d.
Arg	1.3	*	1.0	1.4	tr	*	*	1.0	tr	n.d.
Asp	7.0	6.5	4.5	7.0	2.3	5.2	4.8	5.6	5.3	n.d.
Thr	2.2	2.1	1.3	2.3	*	2.3	*	1.8	*	n.d.
Ser	3.0	3.1	1.9	3.6	1.3	4.6	2.2	3.5	2.0	n.d.
Glu	7.4	7.5	5.0	8.5	2.3	5.5	5.4	6.0	4.0	n.d.
Pro	4.2	5.0	3.1	5.5	*	4.1	*	2.8	*	n.d.
Gly	4.9	4.3	2.9	4.5	1.8	4.9	3.4	5.6	3.0	n.d.
Ala	5.2	4.9	3.2	5.2	1.5	6.9	3.4	3.3	2.0	n.d.
Val	3.7	4.5	3.7	5.2	*	4.8	3.6	2.5	*	n.d.
Ile	2.0	2.1	1.7	2.3	1.0	1.7	1.8	1.3	*	n.d.
Leu	2.9	4.6	3.0	4.8	1.5	4.2	3.0	2.3	1.0	n.d.
Tyr	1.9	2.0	1.2	2.3	*	1.7	*	1.2	*	n.d.
Phe	2.3	2.0	1.3	1.8	*	2.3	*	1.0	*	n.d.
Met	1.0	1.0	tr	1.0	tr	*	tr	*	tr	n.d.
Hyp	13.0	pres.	2.1	pres.	*	tr	5.8	pres.	11.5	n.d.

* < 1%; n.d. = não determinado.
pres. = presente.

susceptíveis, em estudo, estavam parcialmente infectadas, não se pode afirmar ainda que esse iminoácido esteja envolvido no processo infeccioso.¹⁰²

Glucosaminas tem sido detectadas como um componente de várias glicoproteínas vegetais, porém, galactosaminas só foram realmente constatadas e identificadas em caules e folhas de Cannabis sativa.^{141,309.}

Somente nos polímeros de carboidratos isolados de cultivar SUS se detectou a presença de aminoaçúcar, o 2-acetamido-deoxi-D-galactose, Tabela I. A ausência desse aminoaçúcar em cultivar RE não era esperada, e nada foi encontrado a respeito de sua possível ligação com processos infecciosos em plantas. Sua ausência não pode ser atribuída a diferentes épocas de colheitas dos vegetais estudados, já que foram colhidas no mesmo mês. É possível que esse fato esteja relacionado a peculiaridades diferenciais entre cultivares SUS e RE de cafeeiro (Fig. 10).

Todas as frações hemicelulósicas foram metiladas pelo método de HAWORTH (3 x) e permetiladas pelo método de HAKOMORI. Optou-se por essa metodologia devido ao fato dos polissacarídeos contendo proteínas serem pouco solúveis em dimetil sulfóxido.²³⁶ A metilação foi considerada completa após a verificação da ausência de absorção de OH⁻ livre na região entre 3.400^{cm-1} a 3.600^{cm-1} do infra-vermelho.³⁷ Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados e analisados por g.l.c. e GC-MS, na forma de acetatos de alditóis. Pelos resultados dessas análises, Tabela V, observa-se que os derivados 2,3,5-tri-0-metil-L-arabinitol, 2,3,4-tri-0-metil-D-xilitol, 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol e 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactitol são provenientes de unidades terminais não redutoras. O derivado 2,3,5-tri-0-metil-L-arabinitol foi detec-

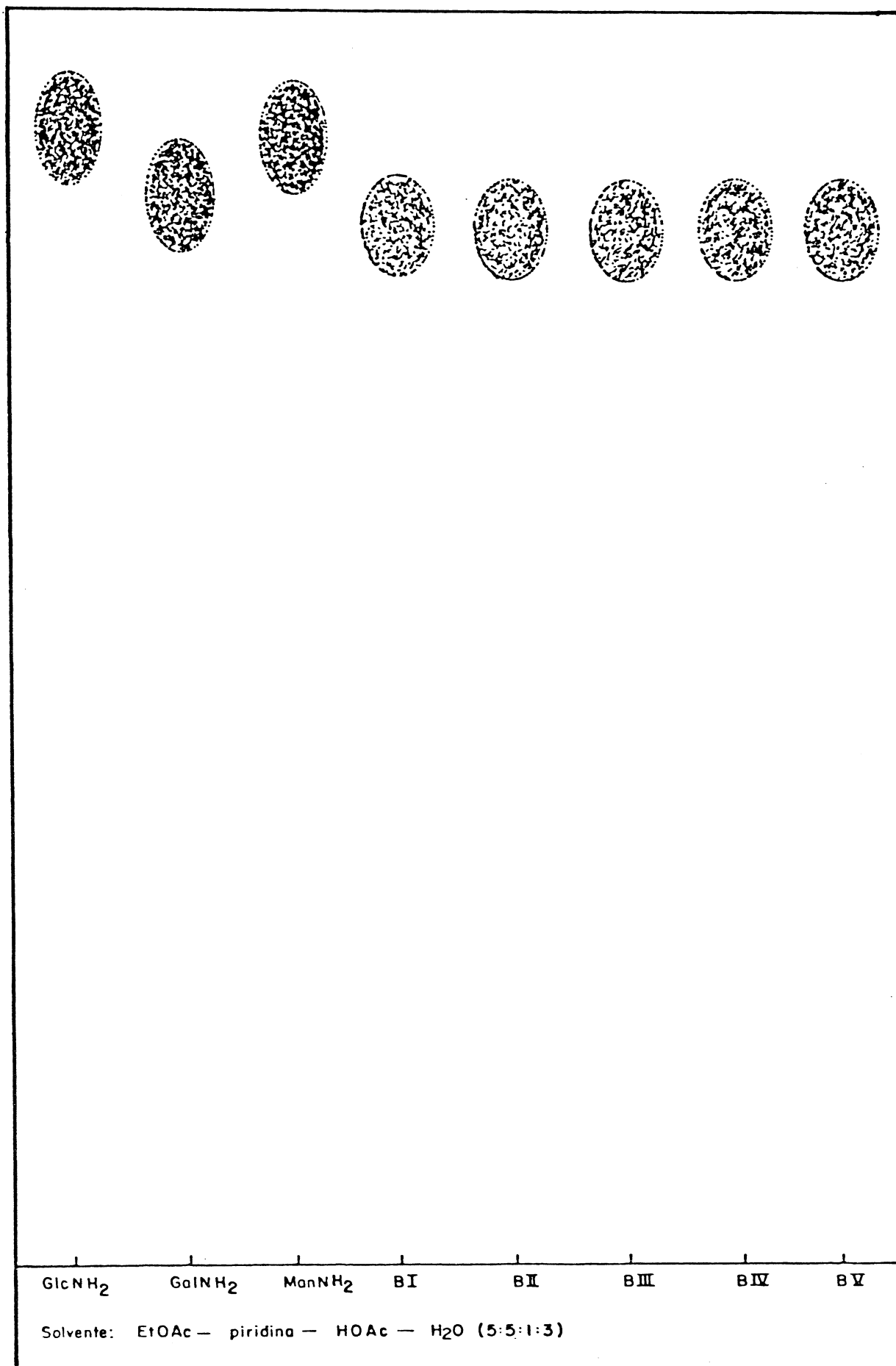


Fig. 10 - C.p. do aminoaçúcar presente nas frações SUS, após hidrólise com HCl 4 N e separação em coluna Dowex 50 x 8 f. H⁺. Padrões: GlcNH₂ = glucosamina; GalNH₂ = galactosamina e ManNH₂ = manosamina.

tado em maiores proporções nas frações B-I, B-II e B-IV (ácidas), porém, comparando-se os cultivares SUS e RE, esses mesmos derivados aparecem em maiores proporções nas frações RE, exceto na B-I e B-V, o que sugere um maior grau de ramificação por L-arabinose nas hemiceluloses oriundas de cultivares RE. O 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol foi detectado em proporções semelhantes em ambas as frações (SUS e RE), com exceção da fração B-III. Nesta, esse derivado aparece em dobro no cultivar RE, indicando acentuado grau de ramificação por unidades de D-glucose. O derivado 2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol foi identificado em maiores quantidades nas frações SUS B-I, B-II, B-III e B-V, do que nas respectivas frações RE, indicando portanto que as frações SUS são mais ramificadas por unidades de D-xilose. Detectou-se, ainda, entre os produtos de hidrólise dos polissacarídeos metilados a presença do derivado 2,3-di-O-metil-L-arabinitol, o qual ocorre em maior proporção nas frações SUS, com exceção da B-I. A presença de formas furanosídicas de L-arabinose foi ainda corroborada pela facilidade com que estas unidades monossacarídicas foram liberadas na hidrólise ácida parcial realizada em condições brandas (H_2SO_4 0,05N, 80°C, 4,30 h). Por outro lado, a presença de 2,4-di-O-metil-L-arabinitol é prova incontestável da presença de unidades de L-arabinopiranosose 3-O-substituídas, ligadas, provavelmente, a aminoácidos (hidroxiprolina). A identificação do derivado 2,3-di-O-metil-D-xilitol sugere que as cadeias lineares constituídas por unidades de D-xilose encontram-se interligadas através de união do tipo $\beta, 1 \rightarrow 4$. As proporções relativas indicam pequenas variações no tamanho destas cadeias de um cultivar para outro, com exceção da fração B-IV, onde são praticamente iguais para ambos os cultivares. O derivado 3-O-metil-D-xilitol, encontrado em maior proporção nas frações B-I, B-II e

B-IV (Ácidas), do cultivar RE, resulta de um acentuado grau de ramificação por unidades de D-xilose dessas frações polissacarídicas. A maior ramificação dos polímeros existentes no cultivar RE pôde também ser aventada pelo resultado do doseamento colorimétrico a que se submeteu o pó cetônico, que indicou 2,55% e 1,46% de grupos O-acetil, respectivamente, nos cultivares RE e SUS. Esse doseamento foi efetuado em virtude desses grupos serem eliminados pelos tratamentos alcalinos efetuados durante a extração.

As unidades de D-glucose, por sua vez, encontram-se predominantemente interligadas através de união tipo $\beta, 1 \rightarrow 4$, tendo em vista a presença de 2,3,6-tri-O-metil-D-glucose em quantidades relativamente grandes entre os produtos de hidrólise de todas as frações hemicelulósicas metiladas. As frações B-III e B-IV (neutras), provavelmente, são as que contêm as maiores cadeias lineares de D-glucose $\beta, 1 \rightarrow 4$, pois são as que apresentam maiores proporções deste derivado. Comparando-se o conteúdo deste derivado entre os cultivares SUS e RE, observa-se que as frações B-I e B-II, apresentam valores próximos, enquanto que as frações B-III, B-IV e B-V, apresentam variações significativas, mormente a fração B-III. O derivado 2,3-di-O-metil-D-glucose apresenta-se em maior quantidade nas frações B-II e B-III de ambos os cultivares e na fração B-V, do cultivar SUS. Verifica-se, por outro lado, maior predominância deste derivado na maioria das frações RE, exceto na fração B-V. Isto leva a crer que as frações hemicelulósicas de cultivares RE são as mais ramificadas no que se refere as unidades de D-glucose. O derivado 2,6-di-O-metil-D-galactose, no entanto, só foi detectado entre os produtos metilados hidrolisados das frações B-I (SUS e RE), B-IV (SUS e RE) e B-V (RE). A ocorrência destes dois últimos compostos metilados sugere pontos de ramificação, nos quais as uni-

dades de D-glucose estão ligadas através de O-4 e O-6 e as de D-galactose, através de O-3 e O-4. A presença de 2,3,4-tri-O-metilgalactose, detectada em maior proporção nas frações RE, sugere uma ligação do tipo 1 → 6 através de unidades de D-galactose. O derivado 3,6-di-O-metil-D-galactose, presente nas frações B-I(SUS), B-II(SUS e RE), B-III(RE), B-IV(SUS E RE) e B-V(SUS), pode ser resultante de interligações internas ou mesmo produto de desmetilação durante a hidrólise. A ausência de ramnose entre os derivados metilados pode ser explicada por sua decomposição em condições experimentais ou pela pouca sensibilidade do aparelho utilizado a esse monossacarídeo. A Tabela V mostra, ainda, vários produtos não identificados, presentes em quase todas as frações. A análise dos fragmentos obtidos por GC-MS, indicam a possibilidade de que a maioria sejam oriundos de compostos fenólicos derivados de ácido clorogênico (comparar esses fragmentos com os da Fig. 32).

Os dados de metilação sugerem, portanto, que estas frações polissacarídicas possuem estruturas complexas, altamente ramificadas, não sendo possível postular-se uma estrutura correspondente a cada fração estudada. Porém, pode-se afirmar que as frações B-III e B-V (neutras) apresentam um esqueleto principal formado por unidades de D-glucose, unidas por uma ligação tipo $\beta, 1 \rightarrow 4$, mais linear do que a encontrada nas correspondentes frações polissacarídicas B-I, B-II e B-IV (ácidas). Além disso, as frações B-III e B-V (neutras) apresentam ainda uma maior proporção de unidades de 2,3,4-tri-O-metil-D-xilose, indicando com isso que as mesmas possuem um maior número de pontas não redutoras e, por isso, mais ramificadas por unidades de D-xilose, em relação às frações B-I, B-II e B-IV (ácidas). Já as unidades de L-arabinose, quer furanosídicas quer piranosídicas, encontram-se em maior quantidade nas

frações B-I, B-II e B-IV (ácidas), vindo ao encontro do maior conteúdo de aminoácidos encontrados nessas frações. Isso sugere, portanto, serem estas frações peptidoglicanas, o que foi confirmado pelo perfil de eluição dos materiais em coluna de Sepharose 6B - Fig. 13. A presença de maior conteúdo nessas frações de 3-0-metil-D-xilose indica pontos de ramificação 0-4 possivelmente por unidades de D-xilose. A presença do composto 2,3-di-0-metil-D-glucose entre os derivados metilados indica que o esqueleto de glucana possui substituições em 0-6, significando ser a fração B-III (SUS e RE) a mais representativa deste grupo. As unidades de D-galactose encontradas em proporções semelhantes nas estruturas químicas de todas as frações SUS e RE, encontram-se, provavelmente, em cadeias laterais, com pontos de ramificações em 0-2 (2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactose), 0-3 e 0-4 (2,6-di-0-metil-D-galactose). A diferença no conteúdo de D-galactose nas frações B-V, SUS e RE, detectada por hidrólise ácida total (Tabela II), está coerente com os resultados de metilação (2,6-di-0-metil-D-galactose) e indica maior proporção de unidades de D-galactose unidas por ligação 0-3 e 0-4 na estrutura da fração isolada do cultivar RE. Como vimos anteriormente, estas frações mostram, ainda, sensível diferença em suas rotações óticas específicas. Além disso, a degradação enzimática (*H. vastatrix*) dessas hemiceluloses (B-V, SUS e RE), indicaram que os monossacarídeos glucose, galactose, arabinose e o ácido D-glucurônico, foram os mais facilmente hidrolisados. Figs. 20 a 23. Tabelas IX e X.

A relação L-arabinose:D-glucose:D-xilose:D-galactose, encontrada na arabinoxiloglucana (B-V, SUS) é de 15:43:33,5:6, assemelhando-se ao polímero encontrado na cevada¹⁶² e em folhas de tabaco.^{205,206,264} Já em galactoarabinoxiloglucana da fração B-V(RE), essa mesma relação é de 18,0:31,8:23,7:20,9, verificando-se, por-

tanto, uma variação significativa no teor de D-galactose em relação ao cultivar SUS dessa mesma fração. As arabinoxiloglucanas (B-III, SUS e RE) apresentaram a relação L-arabinose:D-glucose:D-xilose:D-galactose, semelhante a das xiloglucanas de cevada e tabaco. Assim sendo, pode-se dizer que os polímeros procedentes dos cultivares SUS e RE, das frações B-III e B-V, são semelhantes àqueles isolados de outros vegetais,^{29,41,146,159,160,170,222,262,263,265,266,290,295} isto é, um esqueleto formado por unidades de D-glucose, ligadas através β , 1 \rightarrow 4 e cadeias laterais formadas provavelmente por unidades D-xilose, ligadas 1 \rightarrow 6, ao esqueleto glucana. Essa xiloglucana apresenta ainda ramificações por L-arabinose e por D-galactose (Fig. 11).

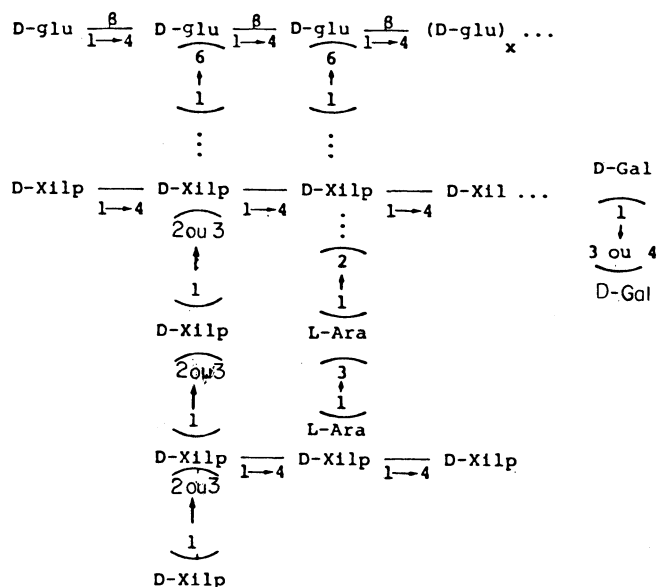


Fig. 11 - Estrutura provável da arabinoxiloglucana.

Através dos resultados da metilação observou-se que as glucarabinoxilanas possuem cadeias lineares de glucana formadas por unidades de D-glucose, ligadas 1 \rightarrow 4, e de xilanas, constituídas por D-xilose, unidas 1 \rightarrow 4, devido a presença de 2,3,6-tri-O-metil-D-glucose e de 2,3-di-O-metil-D-xilose, conforme a Tabela V. Essas cadeias, tanto de D-glucose como de D-xilose, apresentam ramifica-

ções indicadas pela presença de 2,3-di-O-metil-D-glucose e de 3-O-metil-D-xilose, entre os derivados metilados.

Já a hidrólise ácida parcial da fração B-I(SUS), com TFA, após eluição da coluna de carvão celite (1:1) com água e, em seguida, com soluções etanólicas a 5, 10, 15, 30 e 50%, rendeu oligossacarídeos que, analisados por c.p. e por g.l.c., constatou-se serem principalmente di, tri e tetrassacarídeos. Essas análises demonstraram também a ocorrência de oligossacarídeos de maior peso molecular, demonstrando a estrutura extremamente complexa do polímero. (Tabela VIII e Fig. 14).

Por outro lado, os oligossacarídeos obtidos com soluções etanólicas a 10, 30 e 50%, apresentaram somente hidroxiprolina (coloração amarela) como aminoácido, embora aqueles obtidos com soluções etanólicas a 30, 50 e 30 + 50% tenham migrado um pouco menos devido a problemas de contaminantes (Fig. 15). É provável que essa hidroxiprolina seja remanescente do processo de extração das hemiceluloses com KOH a 24%, enquanto que outros aminoácidos, entre eles a serina, provavelmente tenham sido degradados via β -eliminação, nas condições experimentais. Mais adiante foi caracterizada a natureza da ligação glicosil-aminoácido, envolvida no peptidoglicano, constatando-se ser do tipo O-glicosídica, entre L-arabinose e hidroxiprolina.

A hidrólise ácida parcial e as análises por metilação demonstraram que as glucoarabinoxilanas possuem uma estrutura muito complexa, provavelmente como esquematizada na Fig. 12.

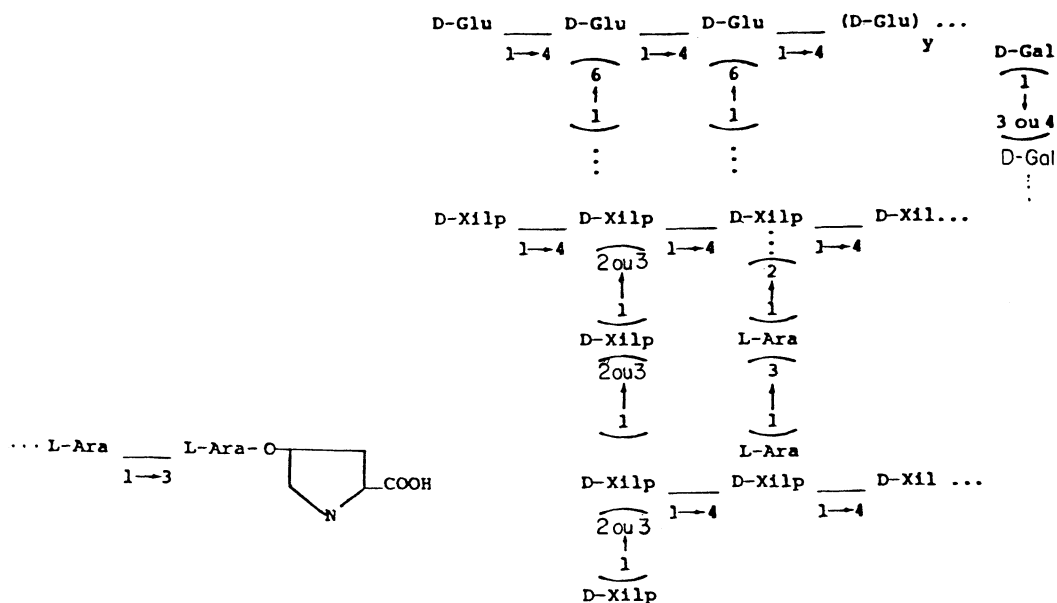


Fig. 12 - Estrutura provável da glucoarabinoxilana.

O consumo de periodato das frações polissacarídicas apresentou um valor bastante alto devido serem esses polímeros constituídos, além de açúcares, também de aminoácidos e compostos fenólicos, passíveis de serem oxidados pelo periodato.⁹⁵

A formação de glicerol como principal álcool da primeira degradação de SMITH e de eritritol (Tabela VII), está em acordo com os resultados de metilação e de hidrólise ácida suave. Assim sendo, o glicerol provém principalmente de ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ de D-xilopiranosose e também de unidades terminais não redutoras de L-arabinofuranose e de hexopiranosose. Analisando-se as Tabelas VI e VII verifica-se que a proporção de glicerol, após 3 degradações sucessivas de SMITH, foi maior nas frações RE.

A obtenção de maior conteúdo de eritritol foi verificada no cultivar SUS nas frações B-II, B-III e B-V, e no cultivar RE nas frações B-I e B-IV, após o tratamento das mesmas com periodato de sódio (3 x).

TABELA VI
 Produtos obtidos após 3 sucessivas degradações de SMITH,
 das frações polissacarídicas, por g.l.c., na forma de
 acetato de alditóis.

Componentes	Proporção relativa (%) *																			
	B-I				B-II				B-III				B-IV				B-V			
	ND		D		ND		D		ND		D		ND		D		ND		D	
SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	
Glicerol	8.1	20.0	19.0	16.5	0.0	13.1	11.6	23.0	0.0	10.0	13.5	18.5	0.0	9.5	10.0	22.0	4.2	21.7	7.0	28.3
Eritritol	7.0	4.0	22.5	29.2	8.8	6.6	40.0	15.8	13.5	12.7	36.0	23.2	1.5	6.0	19.5	19.0	3.2	10.2	38.5	29.0
Treitol	2.0	tr	3.1	8.8	7.0	tr	15.8	8.0	tr	2.0	6.5	15.2	2.5	5.5	17.5	12.0	tr	tr	8.0	tr
L-ramnitol	13.9	16.2	11.0	12.0	10.5	22.5	7.0	12.0	30.5	14.7	12.0	8.0	16.5	10.0	15.0	9.0	26.5	20.0	7.0	8.0
L-arabinitol	32.0	13.0	18.5	12.4	24.5	26.0	12.0	14.7	15.7	9.5	10.3	3.1	26.5	29.0	14.0	15.5	19.5	12.0	18.5	8.5
D-xilitol	4.5	7.0	2.2	7.3	17.5	5.7	4.6	8.5	tr	3.8	4.5	3.0	6.0	3.0	3.0	2.2	11.7	6.5	6.5	5.1
D-manitol	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
D-galactitol	17.5	19.7	11.7	6.1	20.5	14.1	0.0	12.0	15.5	8.0	3.1	7.5	21.0	14.5	0.0	9.5	18.7	11.5	5.0	9.5
D-glucitol	14.0	19.5	11.5	7.0	11.2	11.8	9.0	7.2	24.1	39.0	13.5	21.1	26.0	22.2	19.5	10.5	16.0	18.0	8.5	11.5
Comp.fenólicos	18.5	23.5	3.0	18.0	92.2	21.5	4.5	3.5	98.0	41.0	32.2	22.2	82.5	14.0	21.5	18.5	95.0	40.6	35.0	33.5

* Calculado em relação à área dos picos obtidos, usando-se mistura conhecida de padrões acetilados. Col. OV-225 a 190°C.
 ND = não dialisável; D = dialisável; tr = traços.

TABELA VII
 Produtos das 3 degradações sequenciadas de SMITH,
 analisadas por g.l.c., na forma de acetato de alditóis.

	Proporção relativa (%) [*]											
	Arabinoxilana (B-I, SUS)						Xiloglucana (B-III, SUS)					
	1a. degrad.		2a. degrad.		3a. degrad.		1a. degrad.		2a. degrad.		3a. degrad.	
	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D
Glicerol	12.4	63.8	0.0	10.4	9.7	16.1	13.0	18.0	21.6	28.0	24.1	39.3
Eritritol	9.1	23.3	3.6	19.9	2.2	16.3	26.0	41.6	40.0	51.4	20.8	32.8
Treitol	9.7	12.9	8.0	20.0	2.0	6.3	2.6	7.0	4.2	5.3	16.3	17.0
L-ramnitol	7.5	0.0	5.7	11.0	6.8	6.7	5.4	0.0	0.0	2.9	5.0	3.0
L-arabinitol	21.1	0.0	27.5	11.5	6.0	5.6	9.5	6.9	12.3	3.7	15.5	3.8
D-xilitol	27.2	0.0	10.0	9.0	10.5	20.1	9.1	6.5	10.5	3.7	11.5	3.8
D-manitol	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
D-galactitol	7.0	0.0	6.0	5.0	28.1	8.2	3.5	1.2	0.0	0.0	tr	0.0
D-glucitol	6.0	0.0	39.0	11.9	34.4	20.1	30.5	18.7	11.1	4.9	6.6	0.0
Comp.fenólicos	5.3	28.8	7.2	2.0	2.3	7.8	1.7	1.6	5.7	1.5	23.8	26.7

^{*} Calculado em relação à área dos picos obtidos por g.l.c., coluna B.; ND = não dialisável; D = dialisável.
 tr = traços.

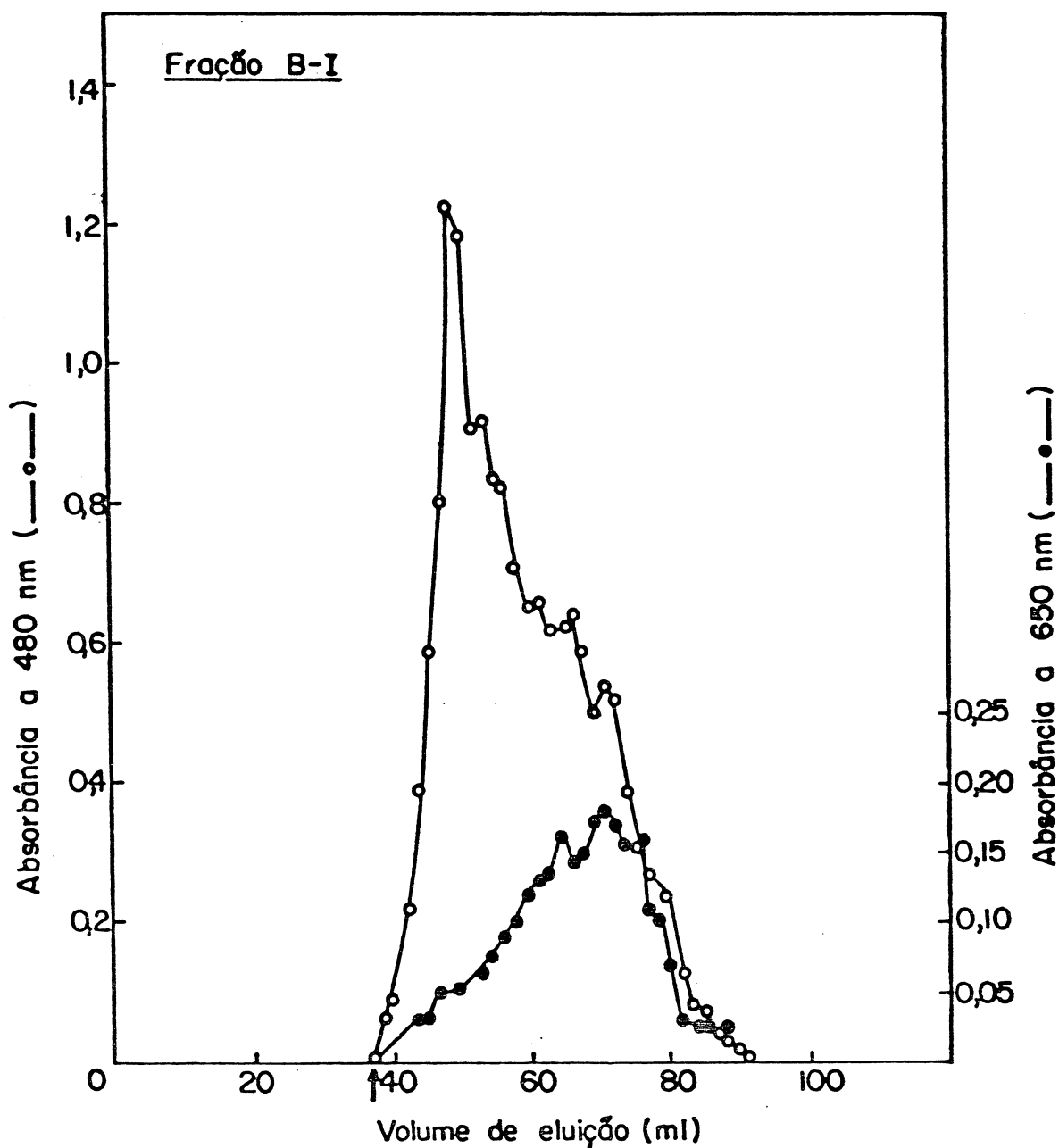


Fig. 13.1 - Filtração em Sepharose 6 B da fração B-I(SUS).
A seta representa o volume morto determinado com Blue Dextran. Os eluatos foram analisados para carboidratos e proteínas.

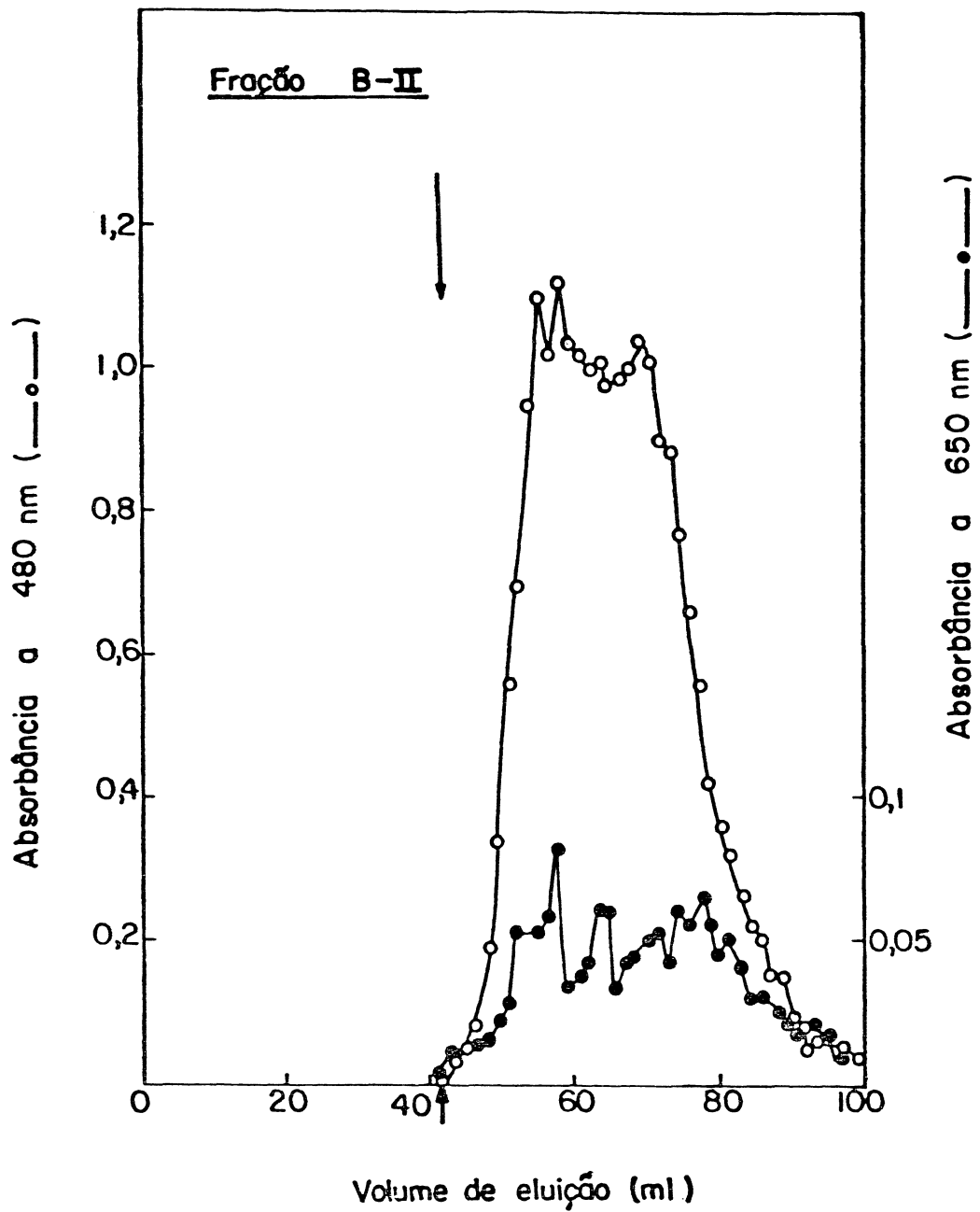


Fig. 13.2 - Filtração em Sepharose 6 B da fração B-II (SUS). A seta representa o valor morto determinado com Blue Dextran. Os eluatos foram analisados para carboidratos e proteínas.

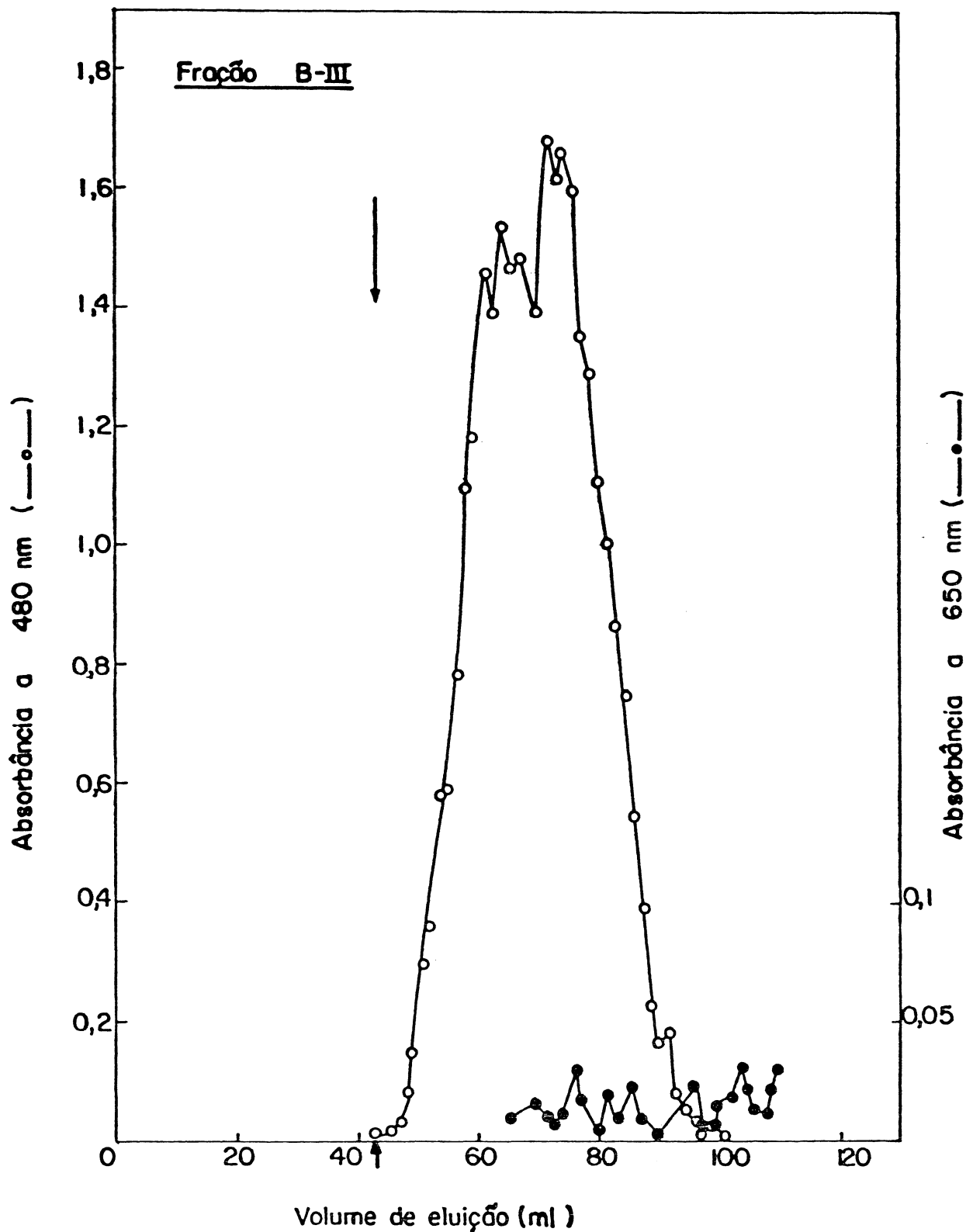


Fig. 13.3 - Filtração em Sepharose 6 B da fração B-III(SUS). A seta representa o valor morto determinado com Blue Dextran. Os eluatos foram analisados para carboidratos e proteínas.

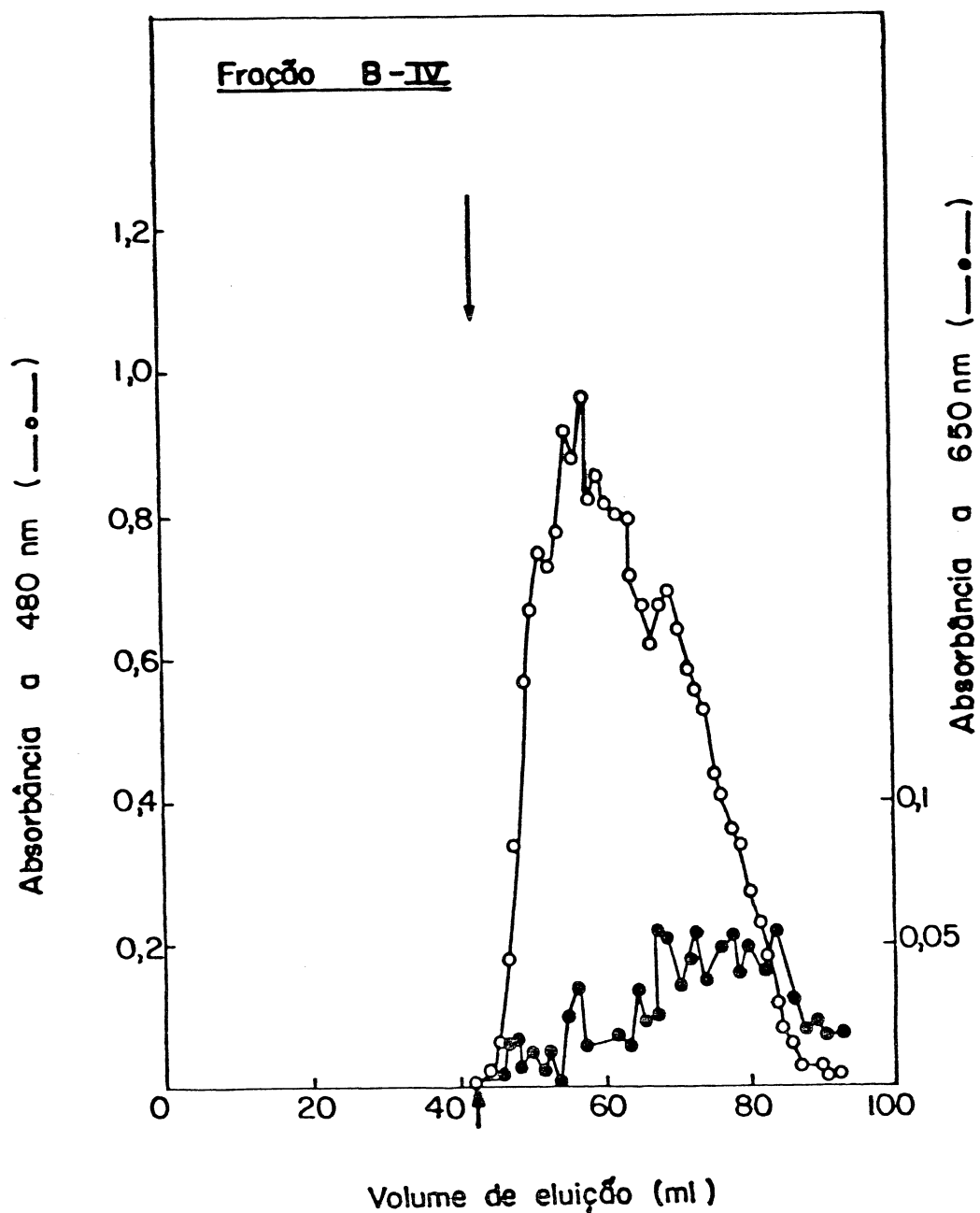


Fig. 13.4 - Filtração em Sepharose 6 B da fração B-IV(SUS). A seta representa o volume morto determinado com Blue Dextran. Os eluatos foram analisados para carboidratos e proteínas.

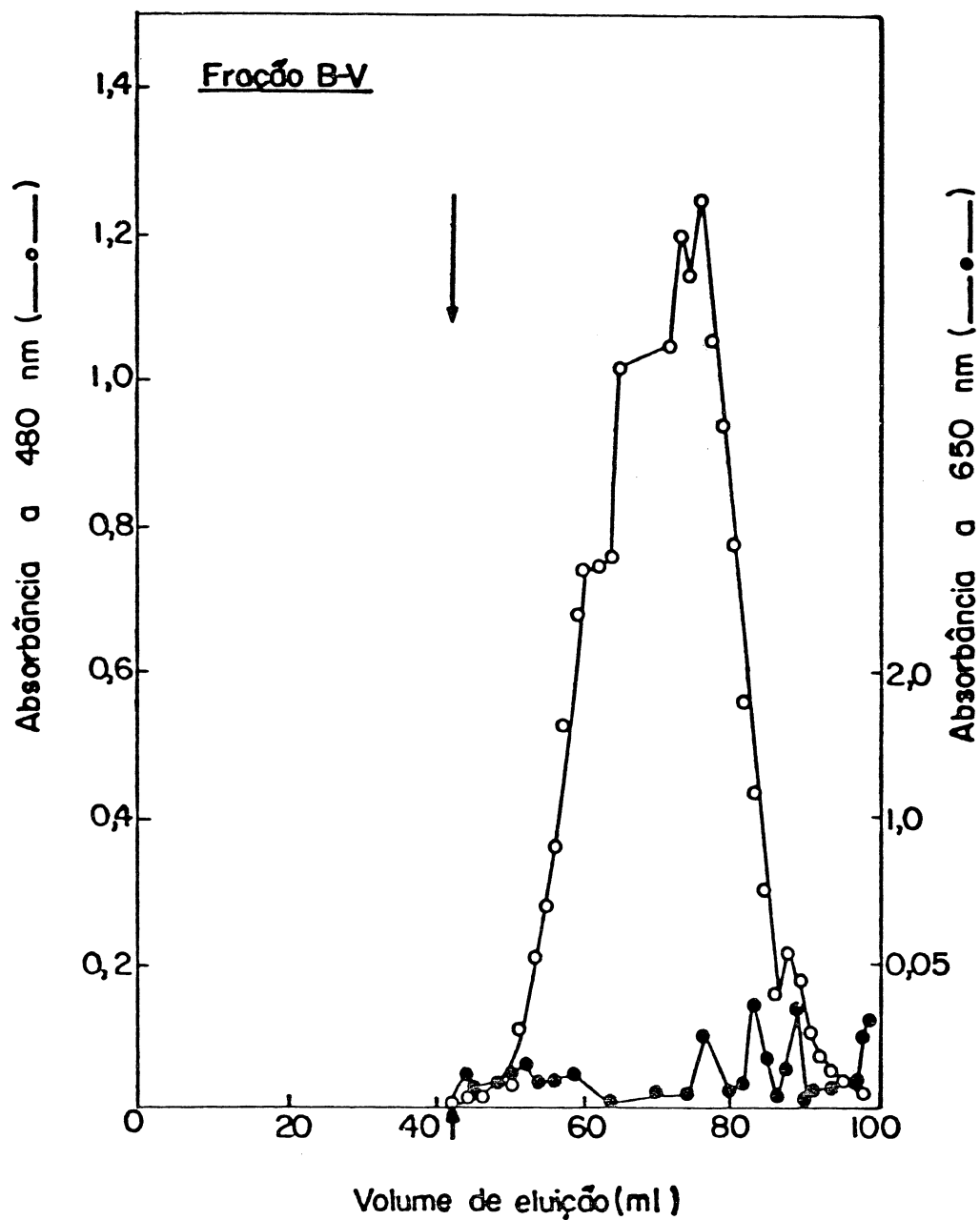


Fig. 13.5 - Filtração em Sepharose 6 B da fração B-V (SUS). A seta representa o volume morto determinado com Blue Dextran. Os eluatos foram analisados para carboidratos e proteínas.

Já o treitol foi obtido em maior quantidade no cultivar SUS das frações B-II, B-III, B-IV e B-V, e no cultivar RE na fração B-I, após 3 sucessivas degradações de SMITH.

A obtenção desses dois compostos resultou da oxidação de unidades de D-glucose e de D-galactose, ligadas através $\beta,1 \rightarrow 4$. Isto indica que as frações polissacarídicas do cultivar SUS possuem cadeias lineares de maior comprimento, formada por unidades desses dois açúcares.

Frente à oxidação pelo periodato de sódio, as frações RE mostraram-se menos vulneráveis que as SUS, indicando serem aquelas mais ramificadas. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por metilação, isto é, comprovam as estruturas ramificadas e muito complexas das hemiceluloses B das folhas do cafeeiro.

As frações SUS foram submetidas a filtração em gel, em coluna de Sepharose 6 B,^{23,69} previamente calibrada com blue dextran. Pela análise dos perfis de eluição (Fig. 13), observa-se que polissacarídeos e proteínas foram eluídos concomitantemente, indicando uma associação molecular entre os dois polímeros. Isto foi observado nas frações B-I, B-II e B-IV (Fig. 13). A fração B-I apresentou um melhor perfil de eluição e foi posteriormente analisada. LAMPORT,^{175,176} estudando glicoproteínas da parede celular de plantas, demonstrou a presença de ligações do tipo α -glicosil entre L-arabinose e 4-trans-hidroxil-L-prolina em cadeias polipeptídicas, a função deste composto e ainda sua ampla distribuição no reino vegetal.

As glicoproteínas parecem desempenhar um papel fundamental na estrutura da parede celular vegetal, pela estabilização do esqueleto polipeptídico, conferindo-lhe uma estrutura muito rígida.

Os oligossacarídeos obtidos da fração B-I (SUS) por hidrólise ácida parcial, separados em coluna de carvão celite 1:1 e eluí-

TABELA VIII

Oligossacarídeos resultantes da hidrólise ácida parcial da fração B-I (SUS), reidrolisados e analisados por g.l.c., na forma de acetato de alditóis.

Eluatos etanólicos	Monossacarídeos (%) [*]					
	L-ramnose	L-arabinose	D-xilose	D-manose	D-galactose	D-glucose
5%	2.7	34.1	4.6	0.0	0.0	58.5
10%	0.0	11.2	30.5	0.0	32.1	26.3
15%	7.1	9.9	21.3	tr	25.1	36.6
30%	11.0	5.0	25.3	tr	9.9	48.7
50%	28.5	4.3	4.9	tr	41.5	20.8

Análises efetuadas em coluna B, à temperatura de 185°C.

*Calculado em relação à área dos picos; tr = traços.

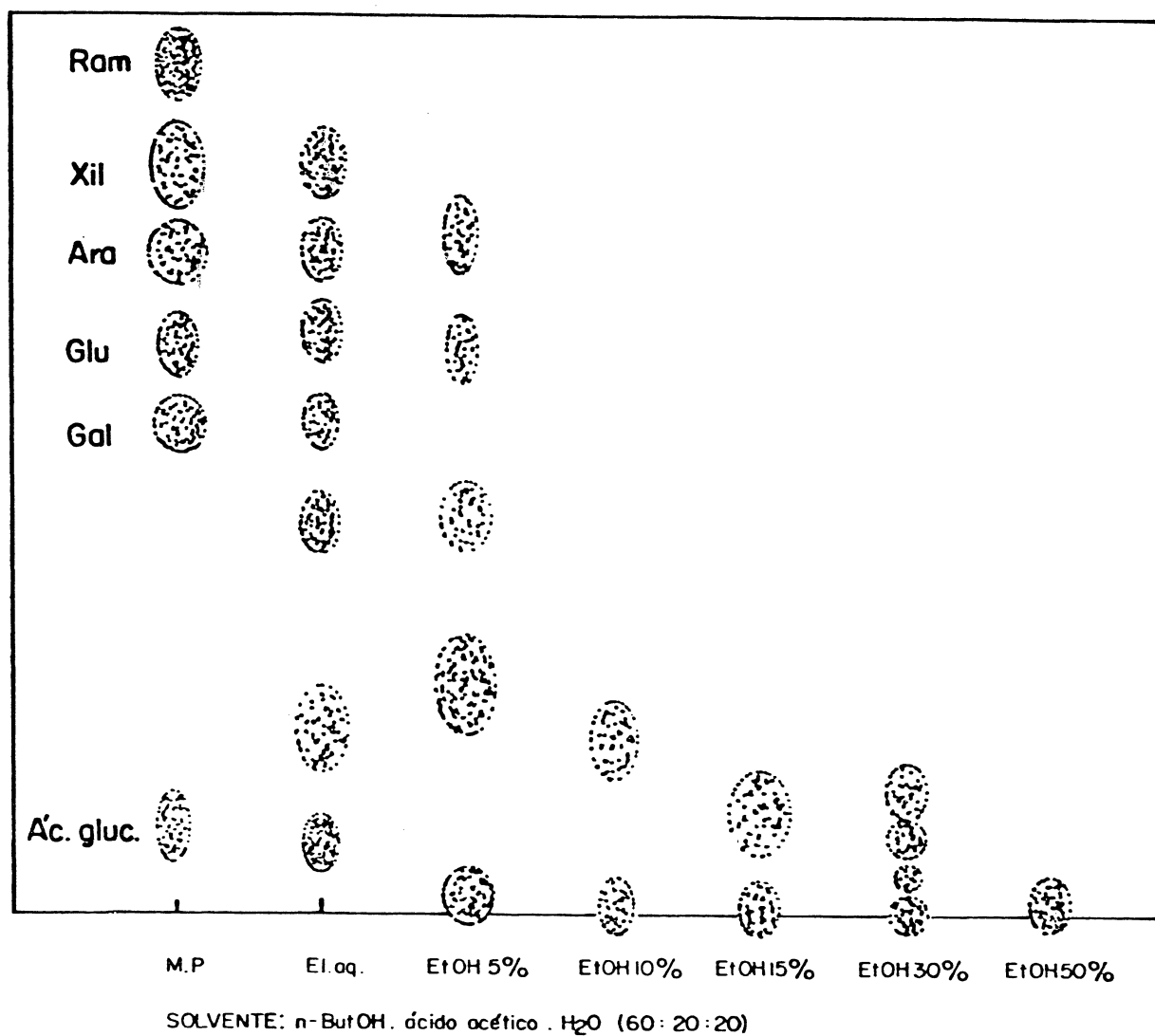


Fig. 14 - C.p. ascendente dos oligossacarídeos. A fração B-I (SUS) foi hidrolisada com TFA e seu produto cromatografado em coluna de carvão:celite (1:1) e separado por eluição, primeiro com água e depois com sol. etanólicas a 5, 10, 15, 30 e 50%. Estas eluições foram submetidas à c.p., solvente a.

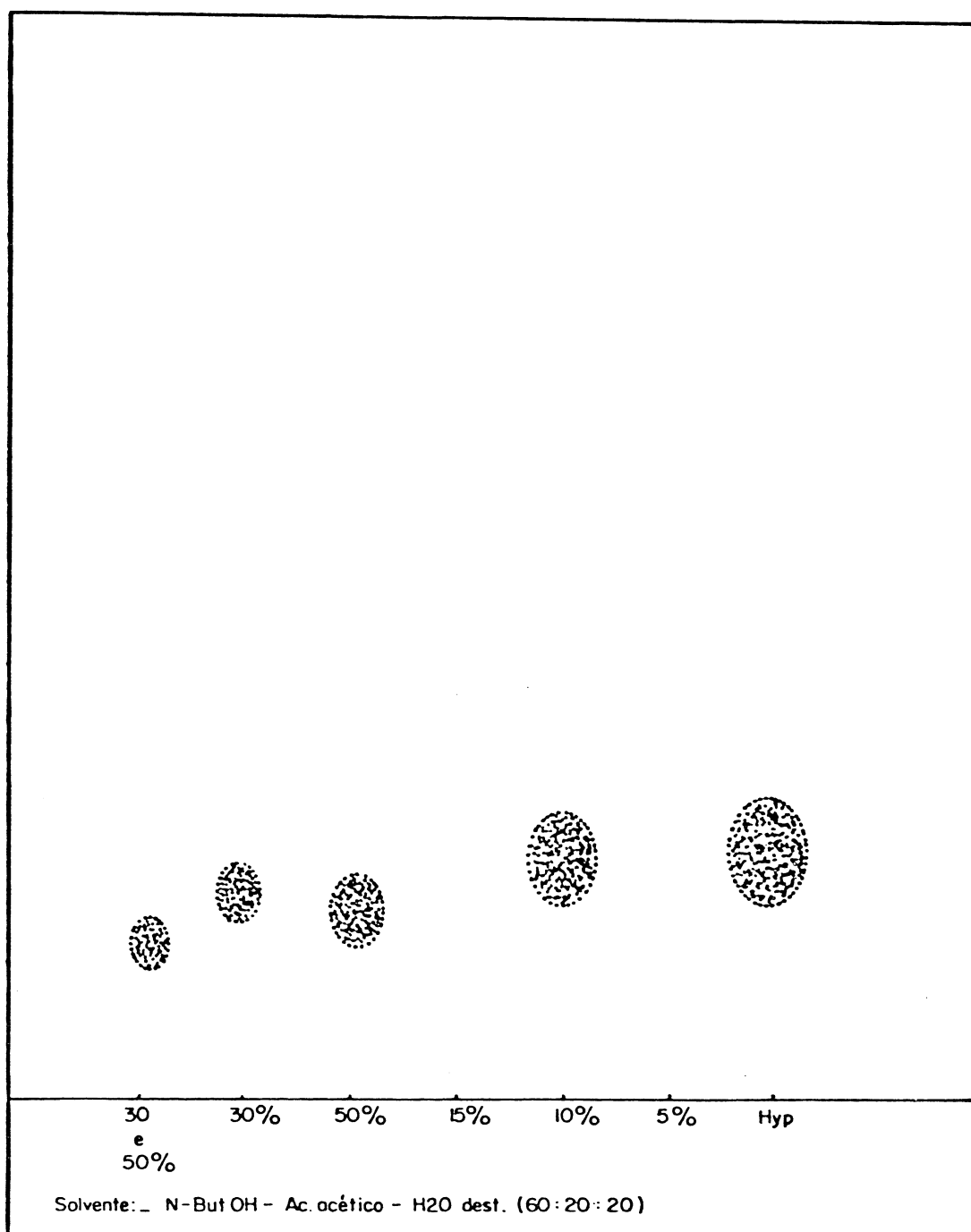


Fig. 15 - T.l.c. para aminoácidos. A fração B-I(SUS) foi hidrolisada com TFA e seu produto cromatografado em coluna de carvão:celite (1:1) e separado por eluição, primeiro com água e depois com sol. etanólicas a 5, 10, 15, 30 e 50%. Os eluatos foram hidrolisados com HCl 6N e analisados em t.l.c., solvente e, com padrão de hidroxiprolina.

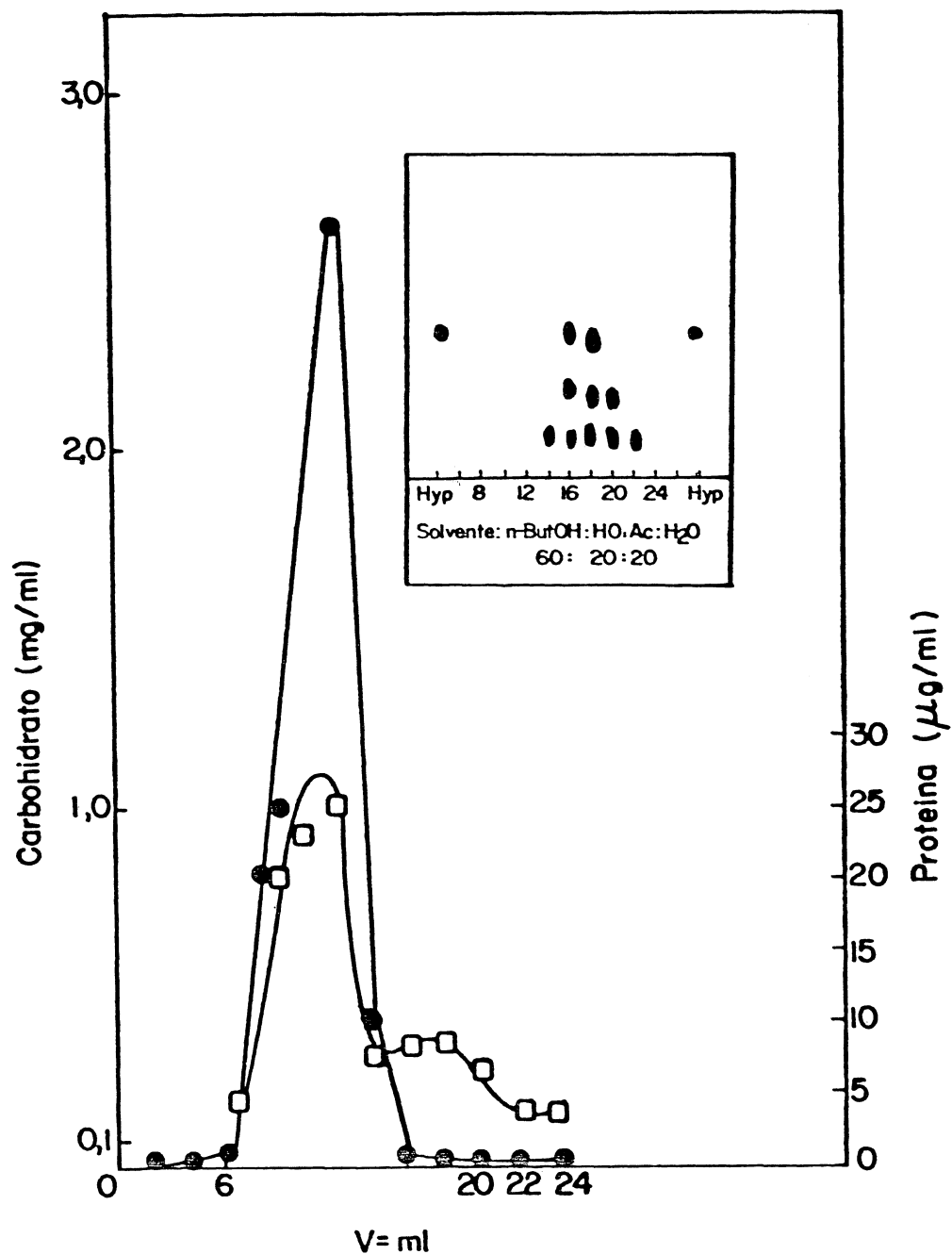


Fig. 16 - Perfil de eluição do hidrolisado da fração B-I (SUS), em Bio Gel P-2, de carboidrato-proteína. A fração foi submetida a hidrólise alcalina com $\text{Ba}(\text{OH})_2$, neutralizada com CH_3COOH e aplicada à coluna, sendo eluída pelo mesmo ácido em sol. 0,1N. Os eluatos foram analisados para carboidrato total pelo método do fenol-ácido sulfúrico (- ● -) e proteínas pelo método de LOWRY (- □ -) e t.l.c. (figura menor).

dos, primeiro com água e depois com soluções etanólicas a 5, 10, 15, 30 e 50%, foram analisados por c.p., solvente a (Fig. 14) e separados em duas porções. Uma delas, após hidrólise com HCl 6 N e análise em t.l.c., solventes e e f, apresentou hidroxiprolina (coloração amarela). Fig. 15. A outra, foi hidrolisada com TFA 1 N e os produtos analisados em g.l.c. na forma de acetatos de alditóis, indicando a presença de L-ramnose, D-xilose, D-galactose e D-glucose em todos os oligossacarídeos (Tabela VIII). Como este experimento não definiu qual o monossacarídeo envolvido na ligação hidroxiprolina-carboidrato, submeteu-se a fração B-I (SUS) à hidrólise alcalina segundo LAMPORT¹⁷⁸ para que ocorresse a precipitação das proteínas não envolvidas na ligação citada. O produto da hidrólise, solubilizado em ácido acético 0,1 N foi aplicado em coluna de Bio Gel P-2 e eluído com o mesmo solvente, a fim de separar os peptidooligossacarídeos (Fig. 16). Da hidrólise alcalina realizada obteve-se dois perfis de eluição. O primeiro deles foi correspondente ao peptidooligossacarídeo e, o segundo, aos aminoácidos livres não envolvidos na ligação carboidrato-proteína. A análise em t.l.c. desses aminoácidos não revelou hidroxiprolina. Observando-se o segundo perfil de eluição, nota-se que a hidrólise alcalina não afetou em nada ou em muito pouco a porção glicosídica do polímero. Os eluatos correspondentes ao primeiro pico foram reunidos e, a seguir, submetidos a uma hidrólise alcalina com redução simultânea do componente carboidrato. Os produtos da hidrólise, por c.p. (solvente a) e por g.l.c., na forma de acetato de alditóis, mostraram L-arabinitol e, por t.l.c. (solvente e), hidroxiprolina (coloração amarela). Figs. 17 e 18. Embora em glicoproteínas de parede celular normalmente ocorra a presença de galactose-serina e arabinose-hidroxiprolina, nas análises realizadas só se obteve

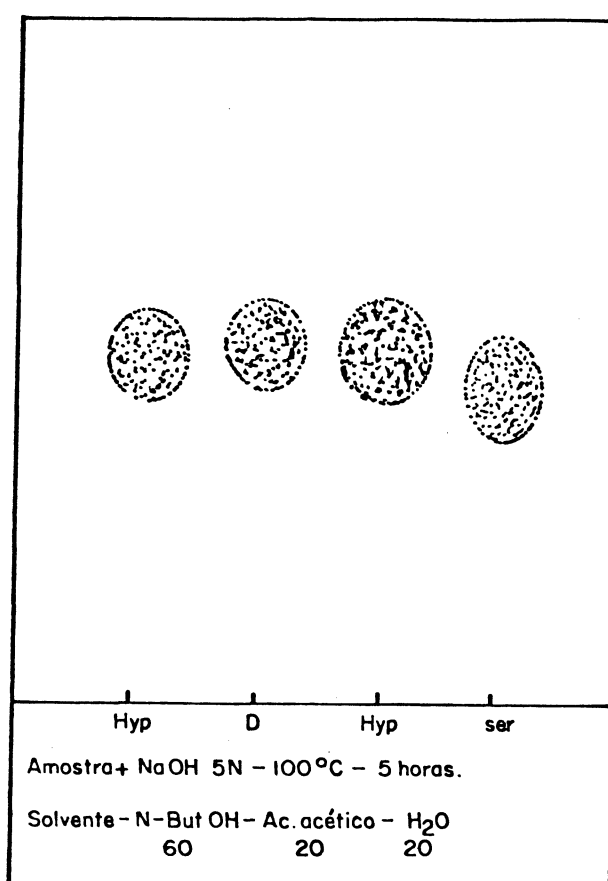


Fig. 17 - T.l.c. dos aminoácidos da fração B-I (SUS). Após hidrólise com $\text{Ba}(\text{OH})_2$, os peptidooligossacarídeos foram cromatografados em Gio Gel P-2, e eluídos com CH_3COOH , 0,1N. O produto, após nova hidrólise alcalina e redução com NaBH_4 , foi analisado em t.l.c., solvente e. Hip = hidroxiprolina padrão; ser = serina padrão; e, D = eluato.

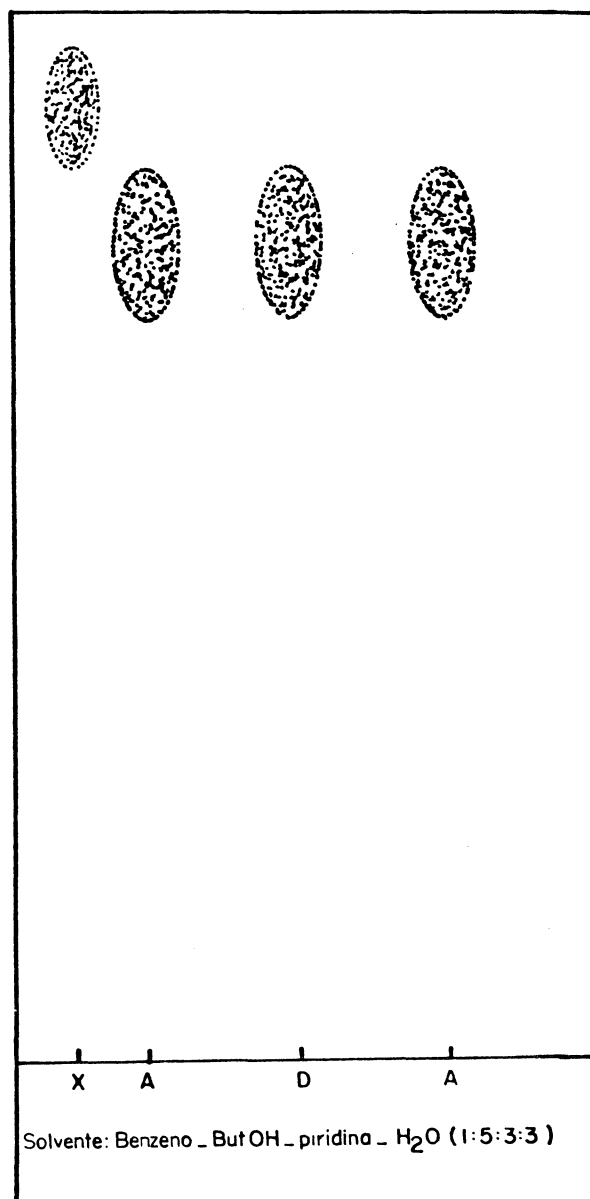


Fig. 18 - C.p. do monossacarídeo da fração B-I (SUS) envolvido na ligação glicosil-aminoácido. Após hidrólise com $\text{Ba}(\text{OH})_2$, os peptidooligossacarídeos foram cromatografados em Bio Gel P-2, eluídos com CH_3COOH , 0,1N. O produto, após nova hidrólise alcalina e redução com NaBH_4 , foi analisado por c.p., solvente a.

A = arabinitol padrão; D = desconhecido; X = xilitol padrão.

arabinose-hidroxi-prolina. É possível que a serina tenha sofrido uma β -eliminação nas condições experimentais ou mesmo que não ocorra esse tipo de aminoácido em peptidoglicana de folhas de cafeeiro.

A análise por metilação (Tabela V), da fração B-I(SUS) indicou a presença de dois derivados significativos de arabinosil, um na ponta não redutora (2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol) e, o outro, como um derivado unido através ligação 1 \rightarrow 3. Este derivado, provavelmente, está envolvido na ligação glicosil-aminoácido da peptidoglicana (Fig. 19).

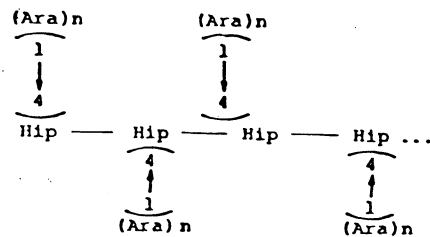


Fig. 19 - Estrutura parcial de peptidoglicana, segundo LAMPORT¹⁷⁹

Embora não tenha sido detectado um aumento significativo no conteúdo de arabinose (Tabela I), já que as folhas do cultivar SUS apresentavam-se parcialmente infectadas, presume-se que durante a infecção ocorra esse aumento. Concomitantemente deve acontecer um aumento no conteúdo de hidroxi-prolina, como uma resposta imediata ao processo infeccioso, embora tenham sido infrutíferos os experimentos realizados no sentido de quantificá-la no cultivar RE. A peptidoglicana detectada na fração B-I(SUS) provavelmente assemelha-se às glicoproteínas isoladas por ESQUERRÉ-TUGAYÉ & MAZAU,¹⁰² por LAMPORT,^{175,176,178} por ASHORD et al.,²⁴ por KEEGSTRÁ et al.,¹⁶³ por AKIYAMA & KATO^{5,6} e por ALLEN et al.^{17,18}. É provável que essa peptidoglicana tenha ativa participação no processo infeccioso, pois existem registros nesse sentido em produtos de igual natureza.¹⁰²

As frações hemicelulósicas apresentam uma variação no conteúdo de monossacarídeos de um cultivar para outro, mais acentuada na fração B-V, conforme mostra a Tabela II. Assim, a xilose e a glucose aparecem em maiores proporções no cultivar SUS, enquanto que a galactose é majoritária no cultivar RE. Os valores de rotação óptica específica confirmam essa variação encontrada na fração B-V, $[\alpha]_D^{25} = +41,79$ e $[\alpha]_D^{25} = +23,19$, para os cultivares SUS e RE, respectivamente, bem como as análises de metilação e de degradação de SMITH.

As hemiceluloses A e B (SUS e RE) quando submetidas à hidrólise por enzimas extra e intracelulares da H. vastatrix, apresentaram um tempo ótimo de incubação em torno de 20-28 h. Após 28 h. houve queda brusca da curva de hidrólise possivelmente por inibição da atividade enzimática por acúmulo de compostos fenólicos. 183,184 Em ordem crescente de proporção, D-galactose, D-glucose, L-arabinose e o ácido D-glucurônico, foram os açúcares resultantes da hidrólise pela ação de enzimas extracelulares (20 h. de incubação). Também em ordem crescente, D-glucose, D-galactose, L-arabinose, D-xilose e ácido D-glucurônico, resultaram da hidrólise por enzimas intracelulares (20 h. de incubação), como exposto nas Figs. 20 a 23.

Após 28 h. de incubação, os produtos da hidrólise enzimática (enzimas extracelulares), analisados por g.l.c., mostraram que D-galactose, D-glucose, L-arabinose e L-ramnose foram os açúcares liberados mais facilmente pelas frações RE, enquanto que, D-glucose, L-arabinose e D-galactose, foram os mais facilmente liberados nas frações SUS, Tabelas IX e X. Fig. 26.

As atividades hidrolíticas das enzimas indicadas nas Tabelas IX e X e Figs. 24 a 26, demonstram uma superioridade da ação

TABELA IX

Produtos resultantes da ação de enzimas extracelulares sobre as hemiceluloses A e B analisados por g.l.c. na forma de acetato de alditóis.

Frações	Monossacarídeos (%)*											
	L-ramnose		L-arabinose		D-xilose		D-manose		D-galactose		D-glucose	
	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE
H. <u>A</u>	0.0	24.9	25.6	19.9	0.0	0.0	tr	0.0	1.5	11,5	72.8	43.7
B-I	0.0	56.0	38.4	0.0	15.3	6.3	tr	0.0	8.4	27.3	37.7	10.4
B-II	0.0	51.1	28.3	33.8	0.0	20.4	tr	0.0	27.4	17.2	44.3	34.0
B-III	0.0	0.0	10.1	18.6	7.8	7.6	0.0	tr	3.8	83.0	78.1	65.3
B-IV	0.0	0.0	46.8	37.8	0.0	24.9	tr	0.0	20.3	12.5	32.8	24.7
B-V	0.0	0.0	25.8	42.7	10.7	13.3	tr	tr	1.9	10.8	61.5	33.1

* Área dos picos dados por g.l.c. (coluna B), analisados na forma de acetatos de alditóis. Tempo de incubação 28 hs a 40°C.

tr = traços.

TABELA X

Produtos resultantes da ação de enzimas intracelulares sobre as hemiceluloses A e B analisados por g.l.c. na forma de acetato de alditóis.

Frações	Monossacarídeos (%)*											
	L-ramnose		L-arabinose		D-xilose		D-manose		D-galactose		D-glucose	
	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE	SUS	RE
H. <u>A</u>	0.0	17.6	38.7	0.0	12.8	0.0	tr	0.0	18.6	6.5	28.8	75.5
B-I	0.0	67.9	31.0	0.0	14.0	0.0	tr	0.0	tr	6.7	55.0	25.4
B-II	0.0	0.0	37.3	9.0	0.0	0.0	tr	0.0	0.0	15.0	62.7	75.0
B-III	0.0	0.0	33.4	4.7	0.0	0.0	tr	0.0	0.0	94.8	66.5	0.0
B-IV	0.0	0.0	45.8	0.0	9.8	0.0	tr	0.0	12.8	34.3	31.4	65.3
B-V	0.0	10.3	40.4	0.0	0.0	8.1	tr	0.0	0.0	19.4	59.6	61.5

* Área dos picos dados por g.l.c. (coluna B), analisados na forma de acetatos de alditóis. Tempo de incubação 28 hs a 40°C.

tr = traços.

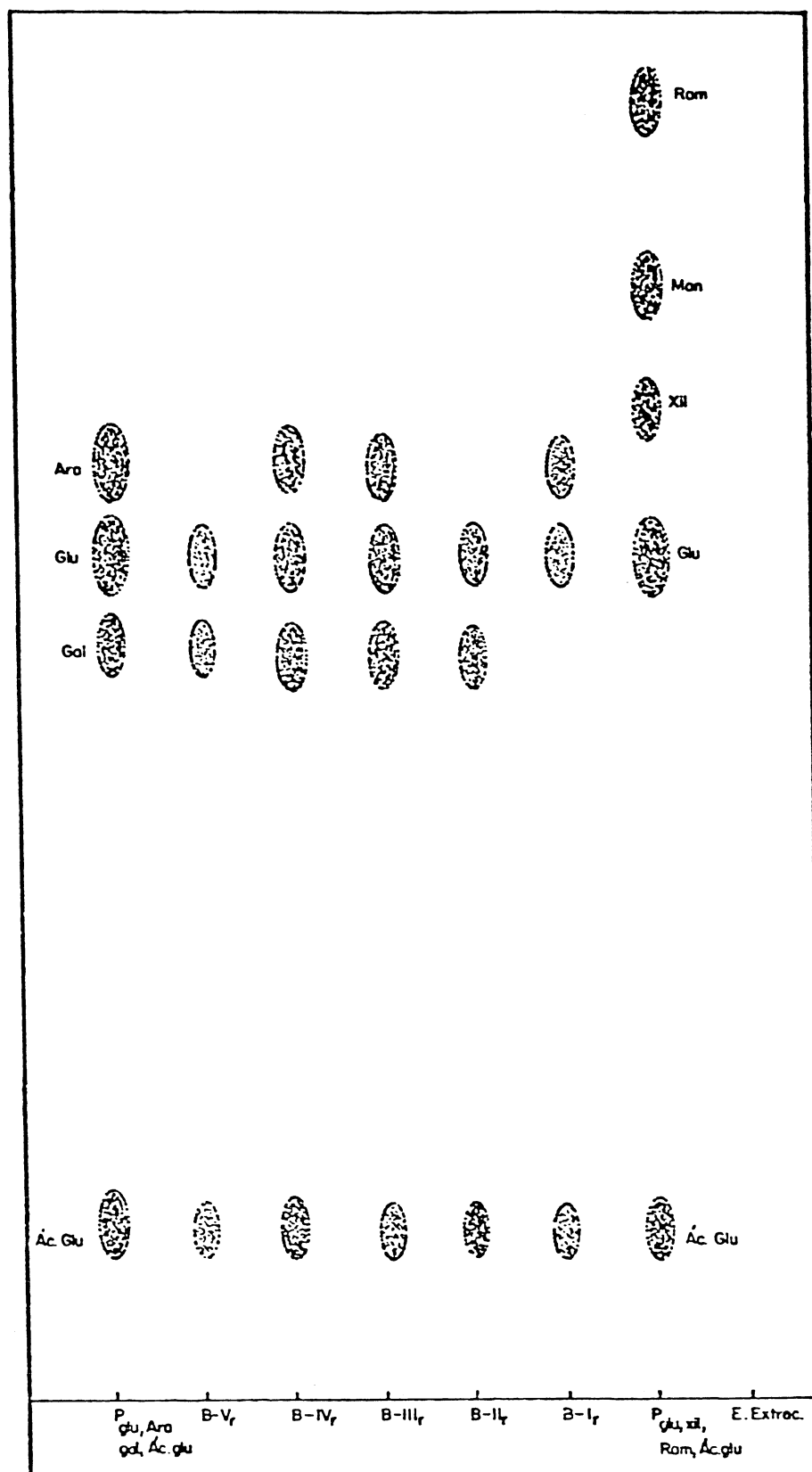


Fig. 20 - C.p. descendente, solvente \underline{h} , dos monossacarídeos resultantes da ação das enzimas extracelulares sobre as frações RE, após 20 h. de incubação a 40°C.

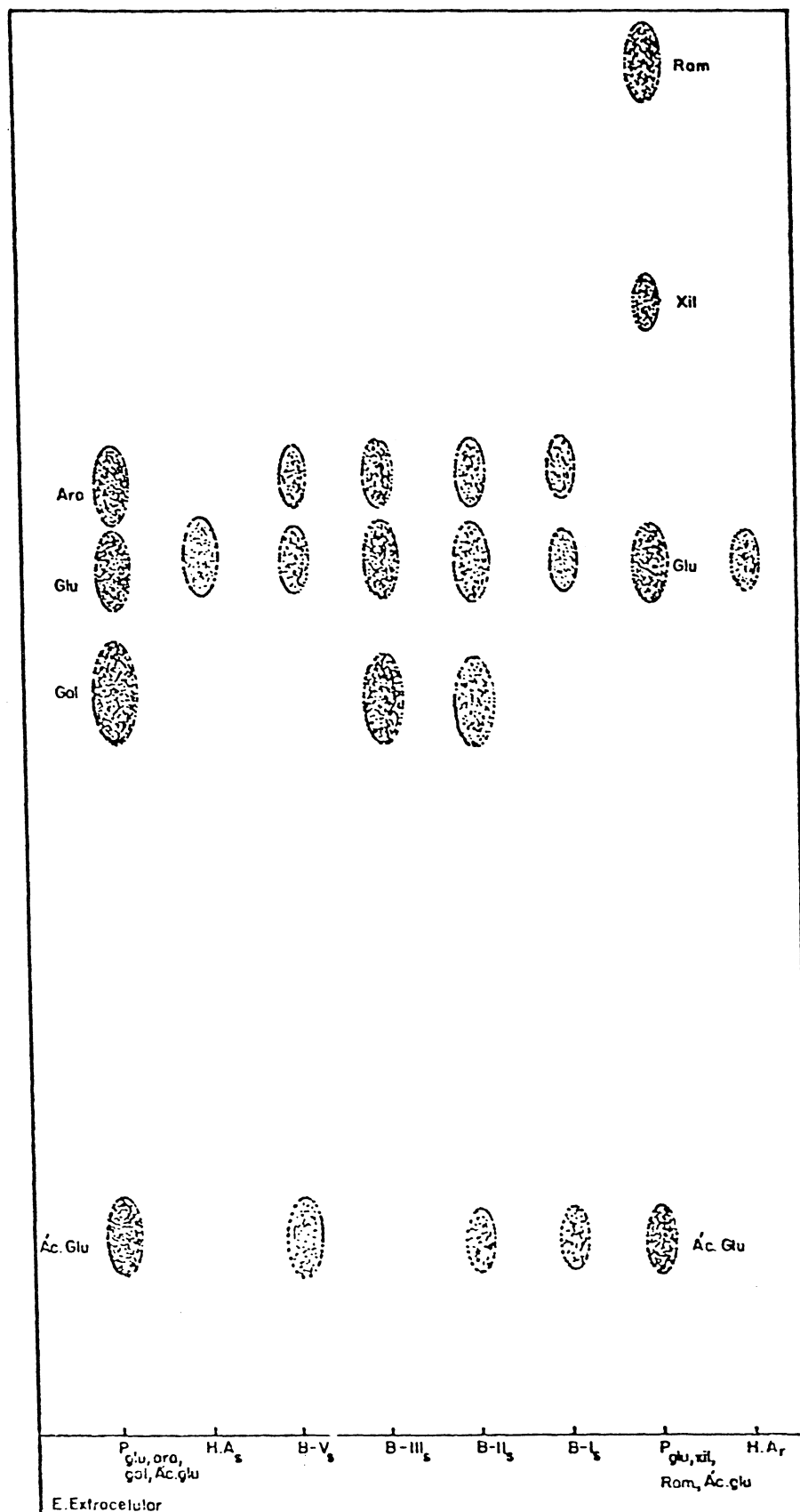


Fig. 21 - C.p. descendente, solvente h, dos monossacarídeos resultantes da ação das enzimas extracelulares sobre as hemiceluloses A (H.A) e B (frações SUS), após 20 h. de incubação a 40°C.

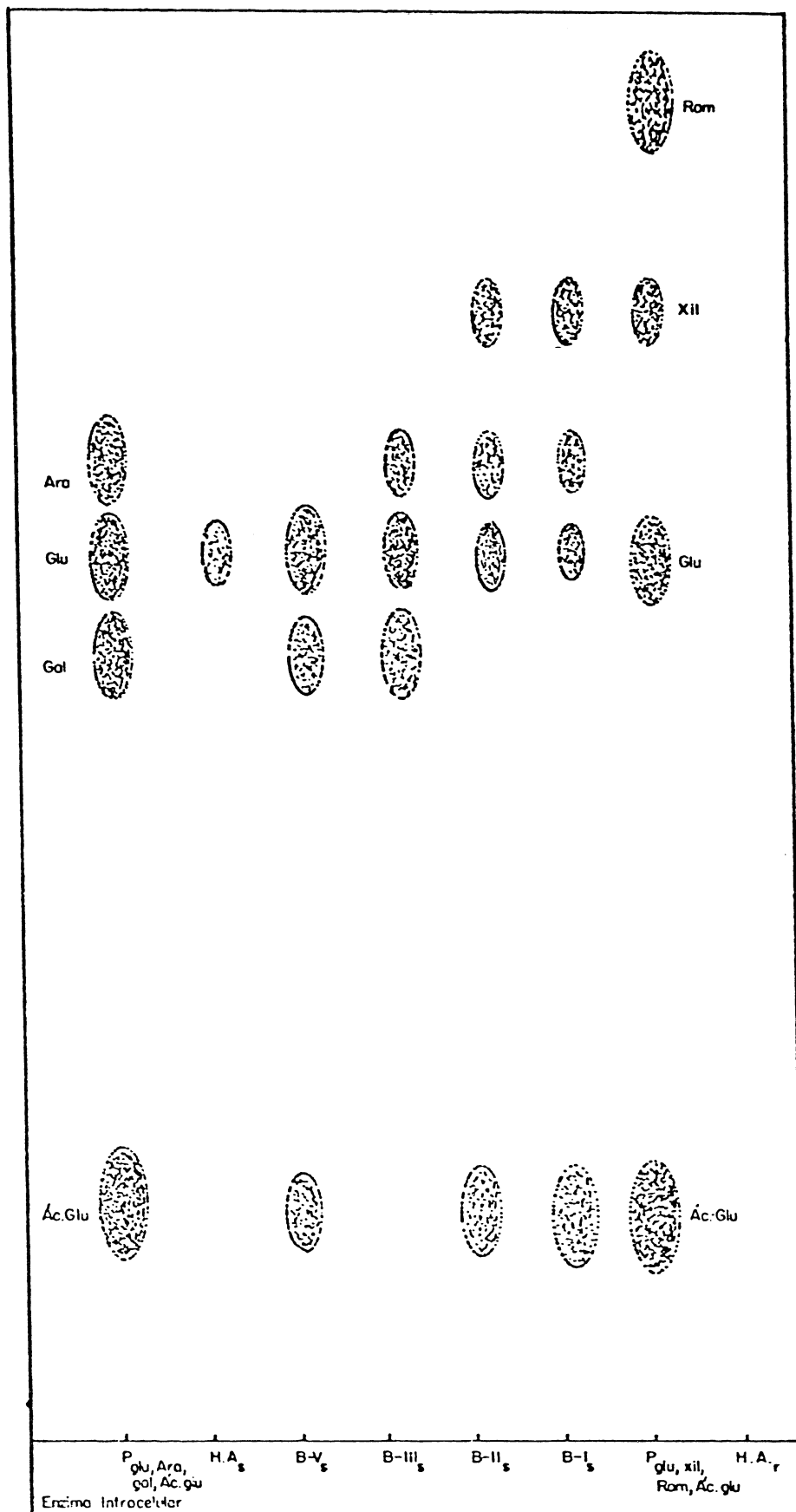


Fig. 22 - C.p. descendente, solvente h, dos monossacarídeos resultantes da ação das enzimas intracelulares sobre as hemiceluloses A (H.A) e B (frações SUS), após 20 h. de incubação a 40°C.

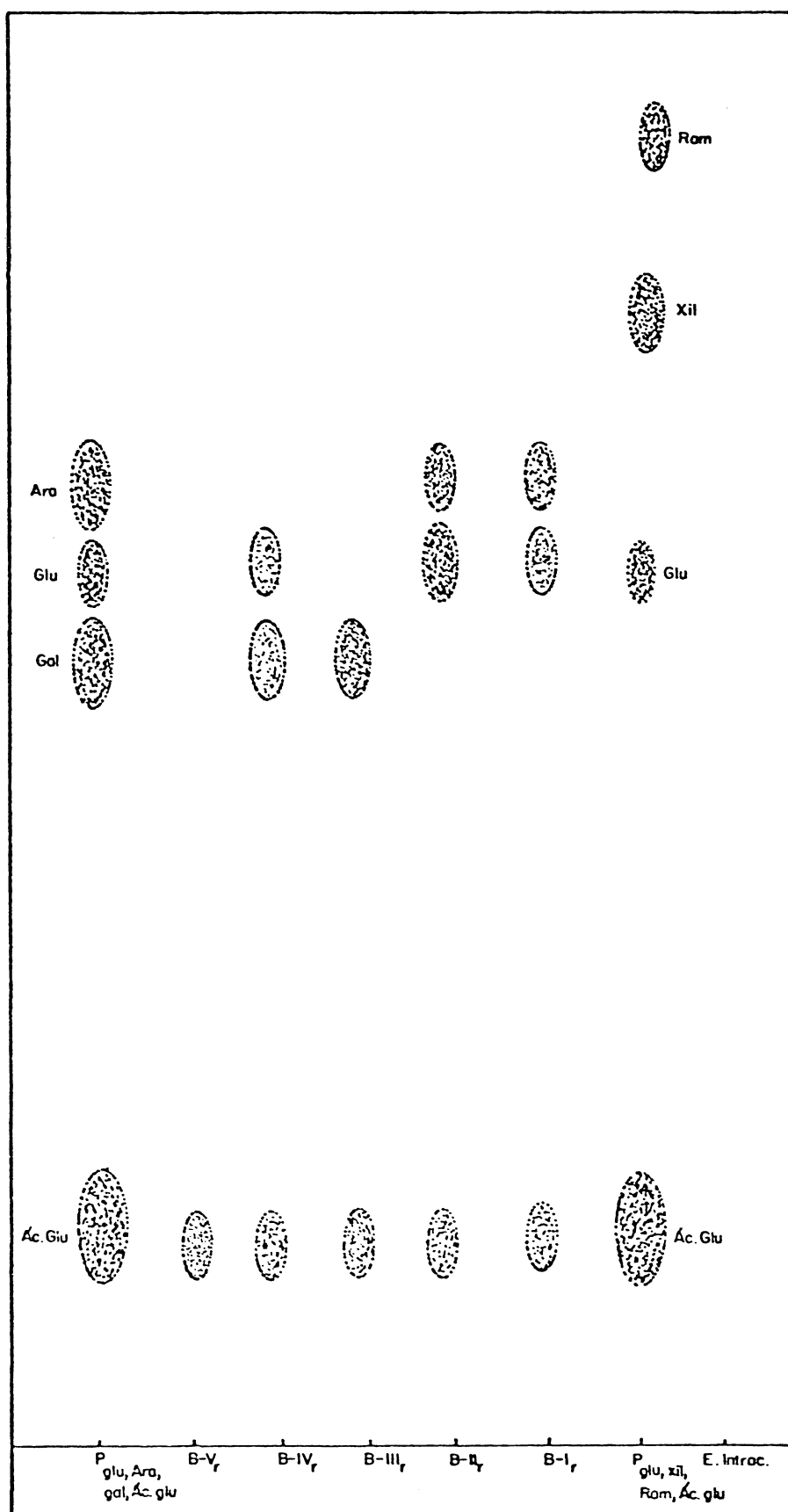


Fig. 23 - C.p. descendente, solvente h, dos monossacarídeos resultantes da ação das enzimas intracelulares sobre as frações RE, após 20 h. de incubação a 40°C.

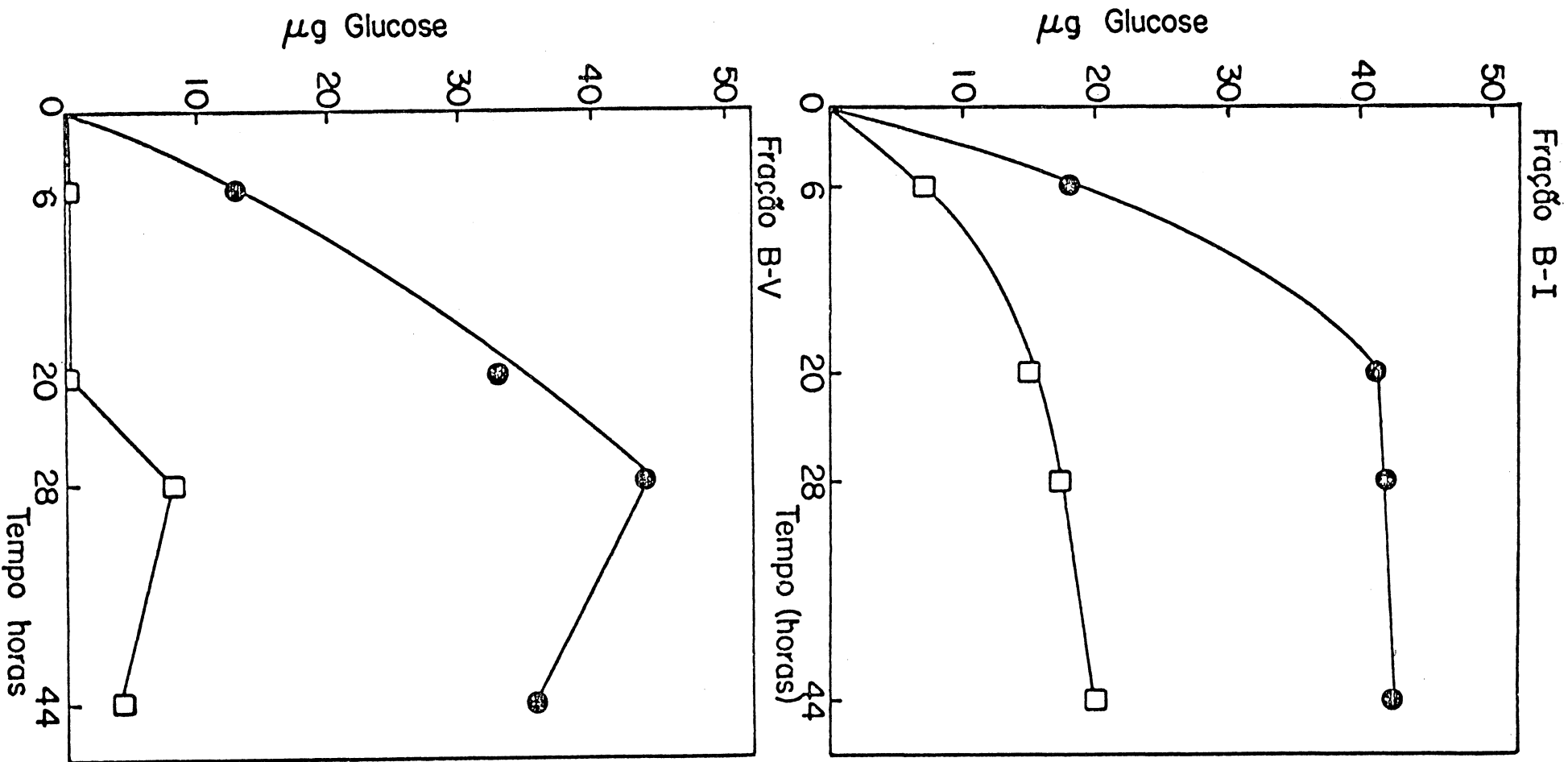


Fig. 24.1. - Atividade da enzima extracelular sobre as frações B-I e B-V, SUS (-●-) e RE (-□-), medida pela liberação de açúcares redutores (SOMOGYI-NELSON), nos seguintes tempos de incubação: 0, 6, 20, 28 e 44 h.

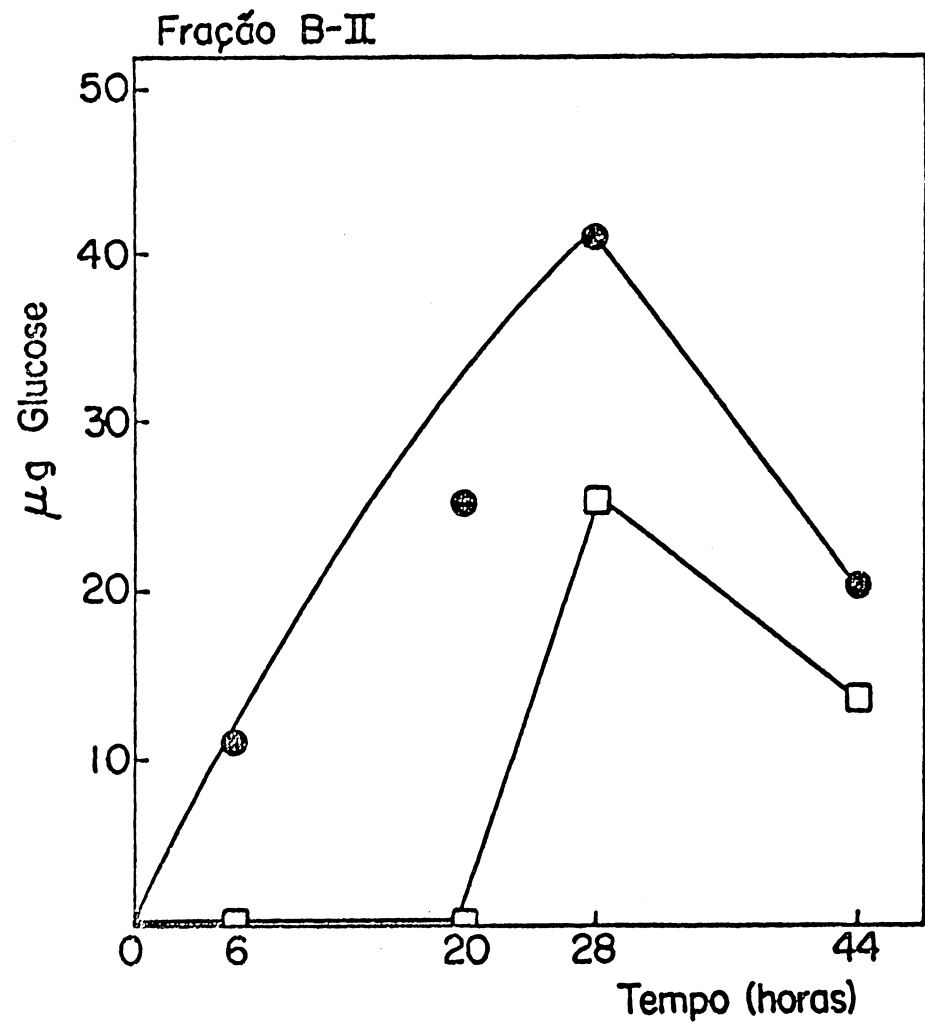
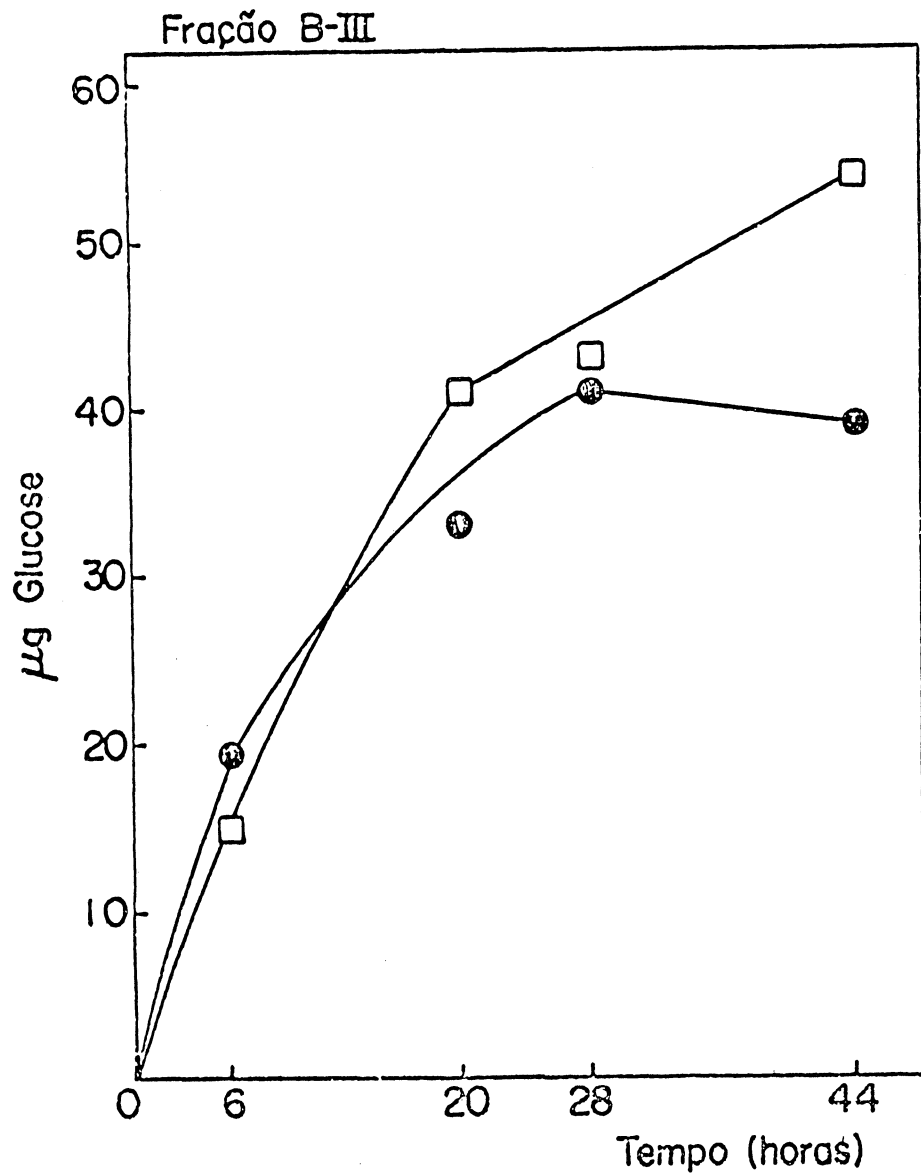


Fig. 24.2 - Atividade da enzima extracelular sobre as frações B-II e B-III, SUS (-●-) e RE (-□-), medida pela liberação de açúcares redutores (SOMOGYI-NELSON), nos seguintes tempos de incubação: 0, 6, 20, 28 e 44 h.

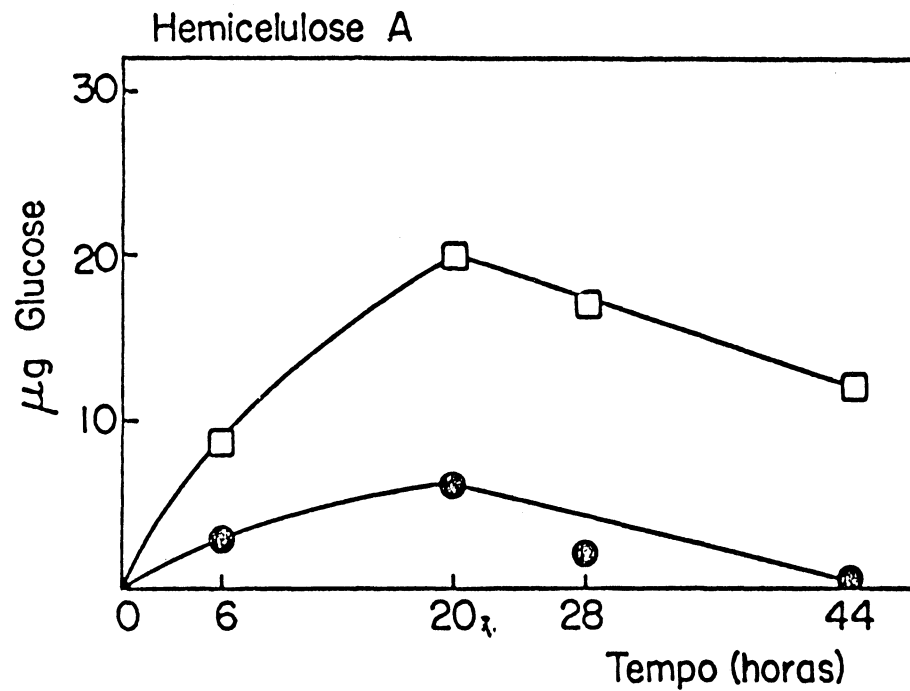
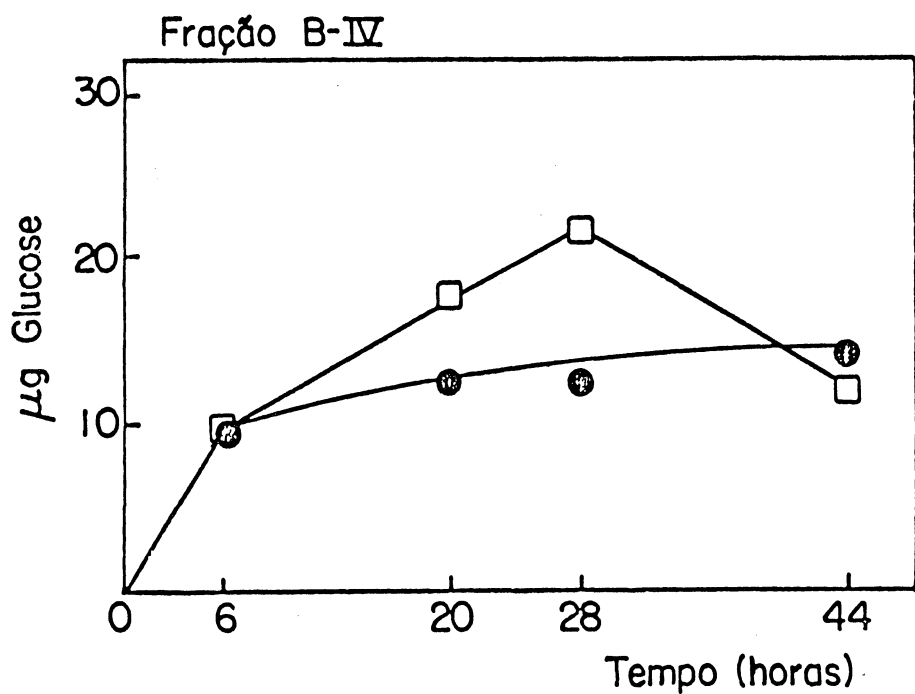


Fig. 24.3 - Atividade da enzima extracelular sobre a hemicelulose A e a fração B-IV, SUS (-●-) e RE (-□-), medida pela liberação de açúcares reductores (SOMOGYI-NELSON), nos seguintes tempos de incubação: 0, 6, 20, 28 e 44 h.

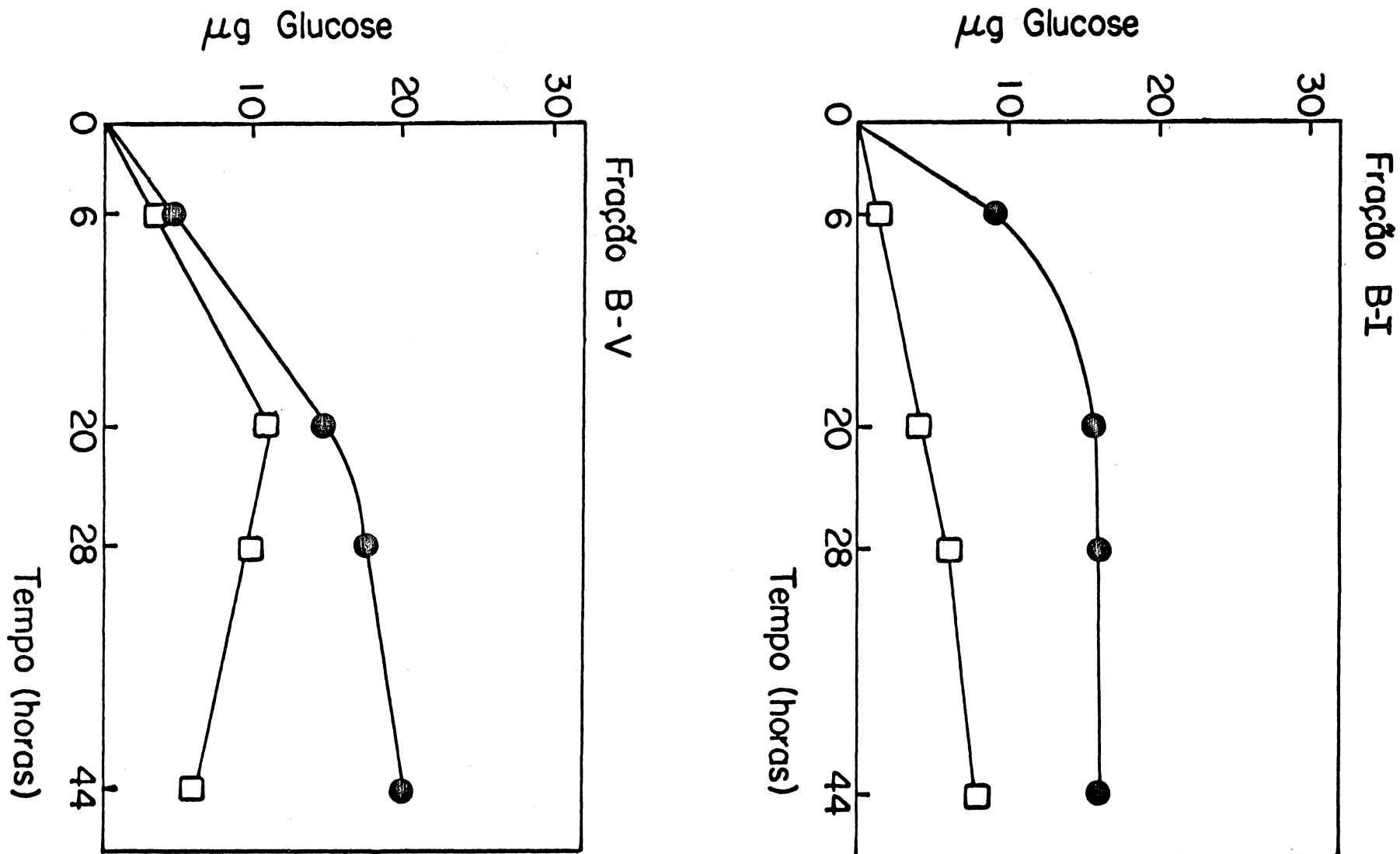


Fig. 25.1 - Atividade da enzima intracelular sobre as frações B-I e B-V, SUS (-●-) e RE (-□-), medida pela liberação de açúcares redutores (SOMOGYI-NELSON), nos seguintes tempos de incubação: 0, 6, 20, 28 e 44 h.

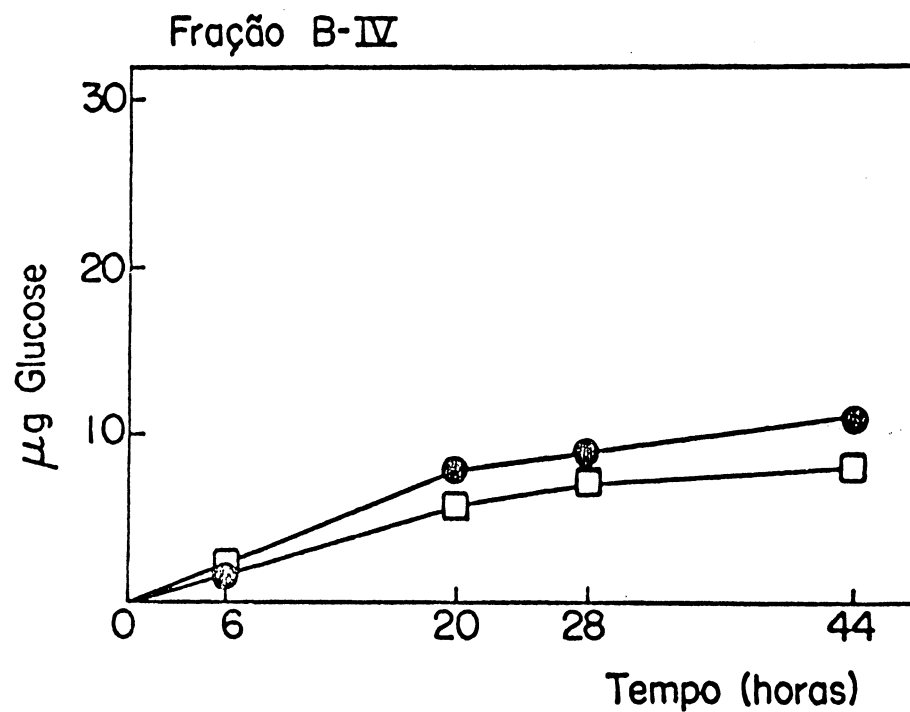
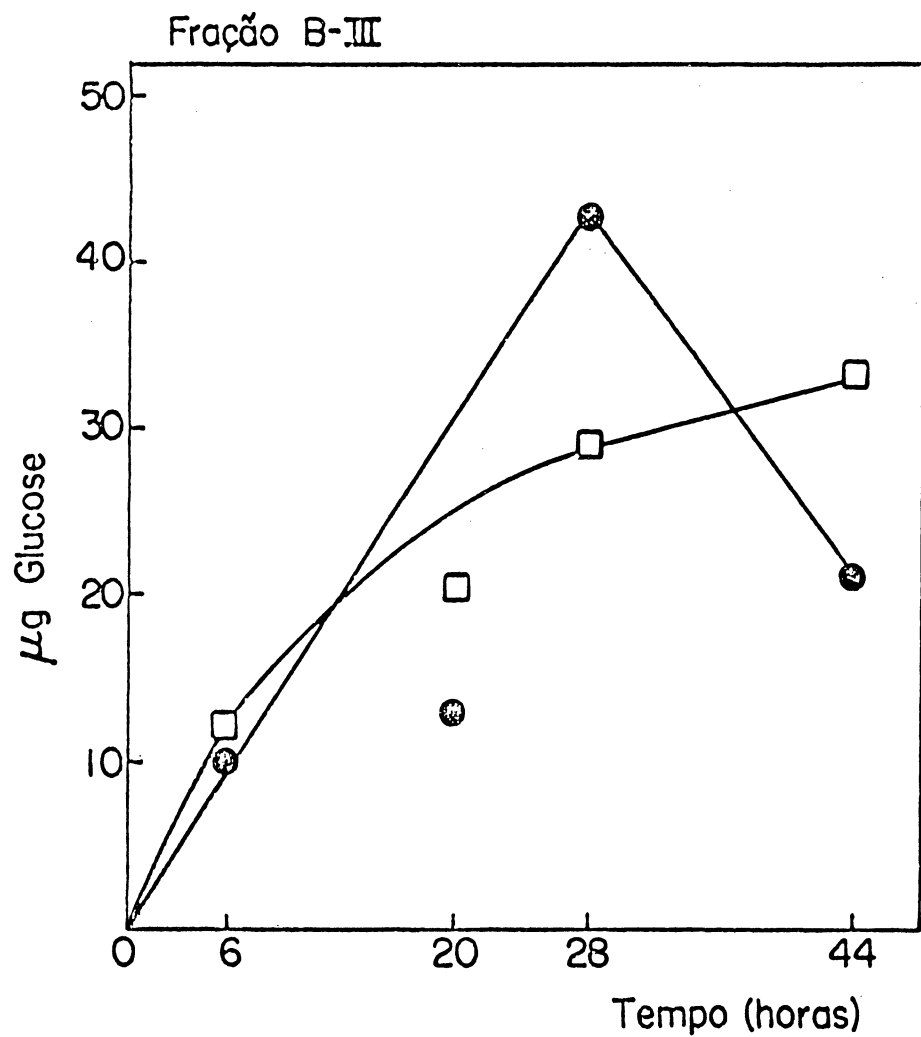


Fig. 25.2 - Atividade da enzima intracelular sobre as frações B-III e B-IV, SUS (-●-) e RE (-□-), medida pela liberação de açúcares redutores (SOMOGYI-NELSON), nos seguintes tempos de incubação: 0, 6, 20, 28 e 44 h.

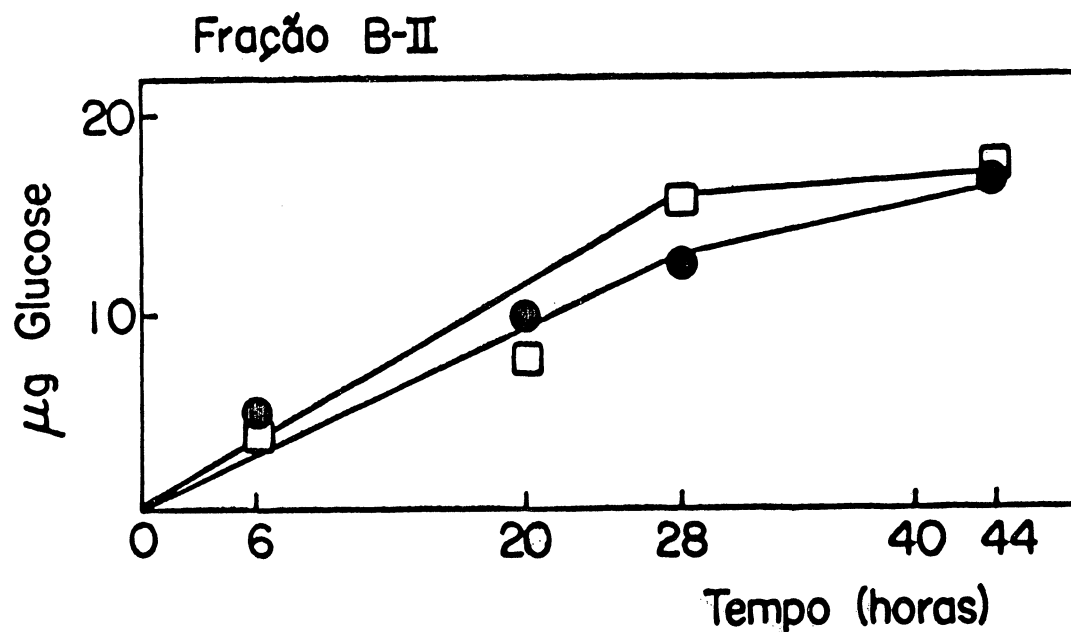
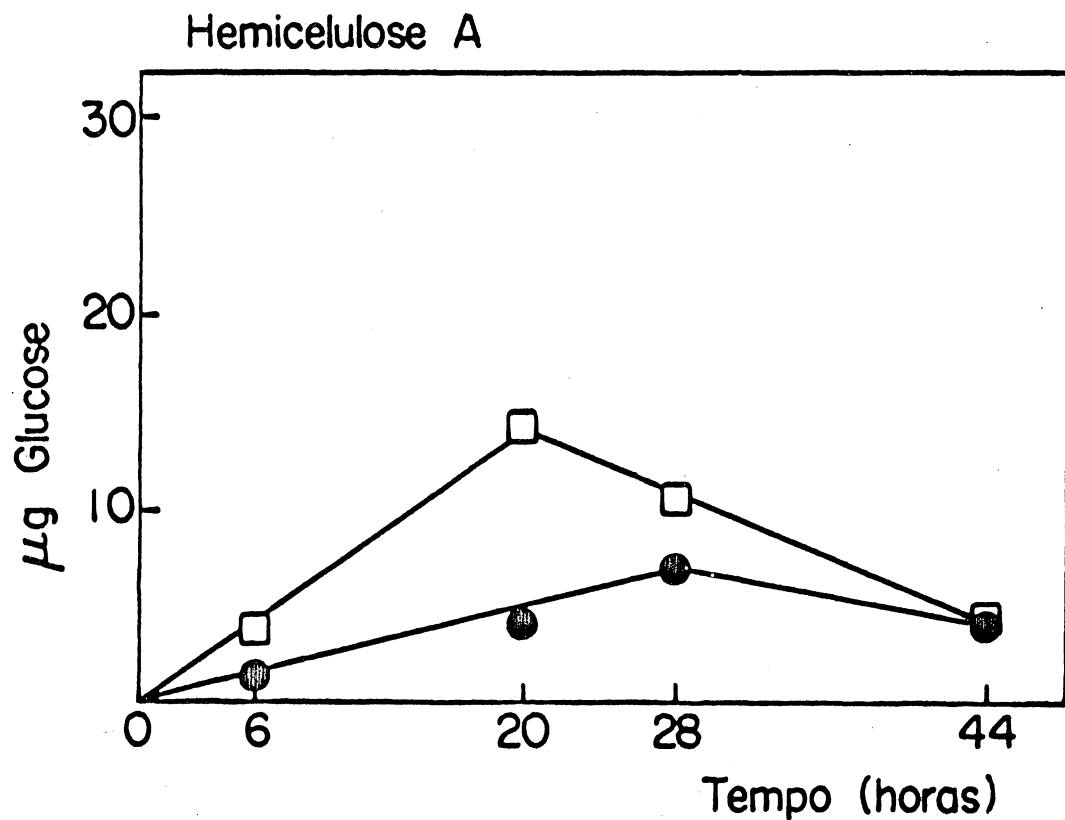


Fig. 25.3 - Atividade de enzima intracelular sobre a hemicelulose A e fração B-II, SUS (-●-) e RE (-□-), medida pela liberação de açúcares redutores, (SOMOGYI-NELSON), nos seguintes tempos de incubação: 0, 6, 20, 28 e 44 h.

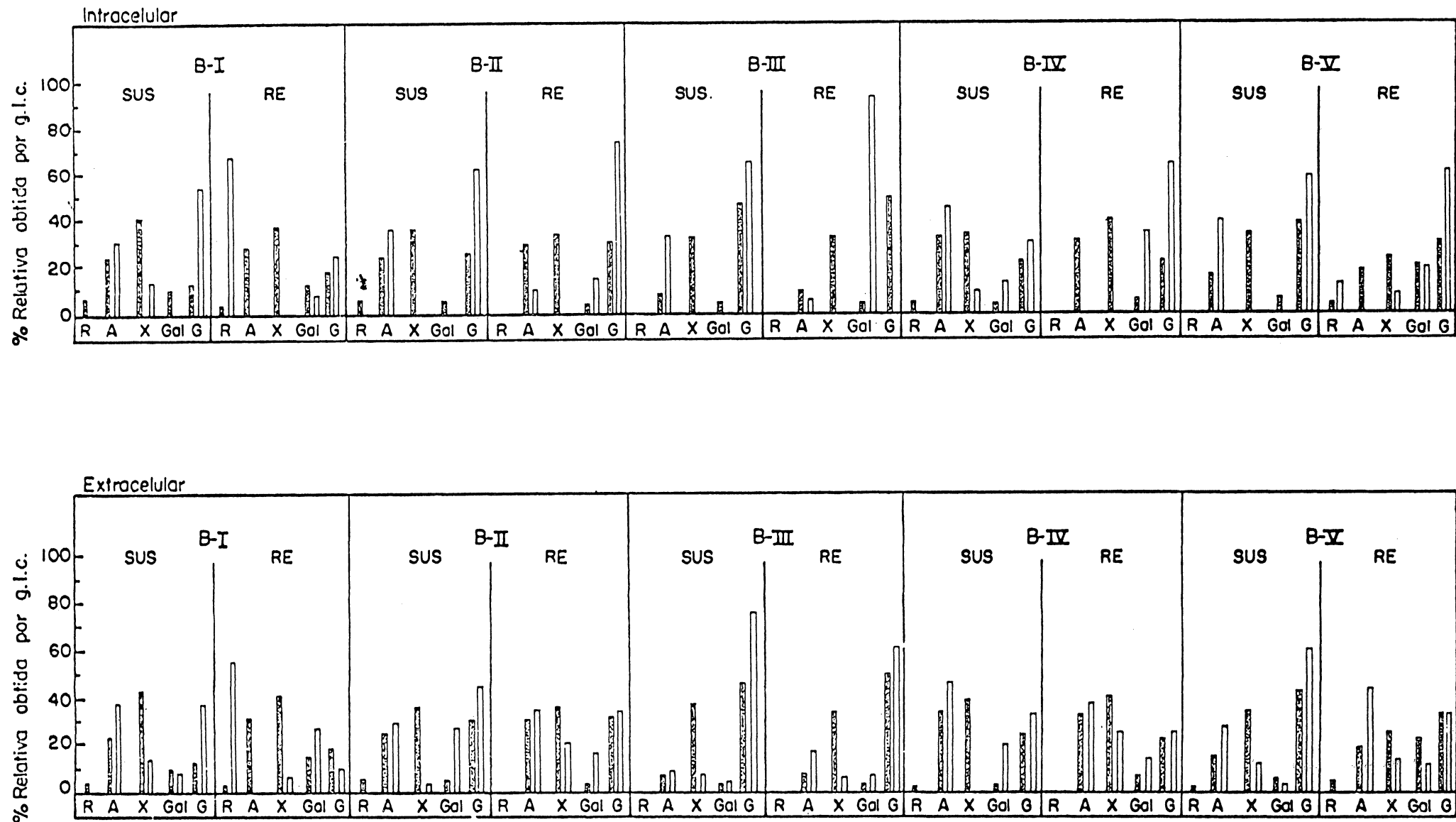


Fig. 26 - Produtos da hidrólise enzimática, a 40°C., analisados por g.l.c. na forma de acetato de alditóis (coluna B). R = ramnose; A = arabinose; X = Xilose; Gal = galactose e G = glucose. Coluna cheia = produto da hidrólise química do polissacarídeo original. Coluna branca = produto da hidrólise enzimática parcial (28 h. de incubação).

das hidrolases extracelulares, por maior eficiência na hidrólise dos polímeros de D-glucose e de D-galactose das frações SUS e RE, do que as hidrolases intracelulares.

Assim, presume-se que D-glucose, D-galactose e L-arabinose são os principais açúcares utilizados como fonte de carbono pelo fungo da ferrugem, seguidos da D-xilose. Esses monossacarídeos foram principalmente hidrolisados nas frações B-I e B-V, como mostram as Figs. 20 a 23 e 26, bem como as Tabelas IX e X.

Esses resultados concordam com os registrados na Tabela II, com os obtidos por AURIOL & TOUZÉ³⁴ e, ainda, parcialmente, com os alcançados por TATAREAU & AURIOL²⁸³ e por MCNAB et al.¹⁹⁷ ao analisarem a ação enzimática de Colletotrichum lindemuthianum, sobre parede celular e polissacarídeos extracelulares de uma suspensão de cultura de sicamore.

Observa-se, portanto, que as enzimas extracelulares são mais ativas sobre substratos hemicelulósicos do que as intracelulares, deduzindo-se daí a sua importância no início do processo infeccioso.

Pelo exposto pode-se concluir que os polímeros hemicelulósicos quando hidrolisados pelo fungo da ferrugem, durante a infecção, sofrem a ação de enzimas, principalmente hemicelulases, entre as quais, galactosidases, glicosidases, arabinases, xilosidasases e glucuronases, acarretando uma maior variação à nível de galactose, glucose, arabinose e, menor variação, à nível de xilose. O mesmo fenômeno deve ocorrer "in vivo". Esses resultados corroboram os obtidos por MAXEMEIUC & DIETRICH,¹⁹⁵ por AURIOL & TOUZÉ³⁴ e por AURIOL³⁵ e, ainda, parcialmente, pelos alcançados por NACACHE & DIETRICH,²¹³ por MCNAB et al.¹⁹⁷ e por TATAREAU & AURIOL.

Tal como nos processos infecciosos, durante o crescimento da planta também ocorre uma alteração à nível de D-galactose, D-glucose, L-arabinose e D-xilose.²¹⁷

Os compostos fenólicos, derivados do ácido clorogênico, foram detectados em todas as frações (SUS e RE). O valor computado para compostos fenólicos na Tabela II não expressa o teor real que normalmente ocorre na planta, pois esses compostos além de apresentarem uma grande resistência à hidrólise ácida total, uma parte deles, fortemente ligados ao polímero de açúcar, foi extraído junto com as hemiceluloses por meio da solução de KOH 24%. Além disso, o tratamento prévio dos materiais com mistura metanol-clorofórmio (1:1), à refluxo, extraiu também aqueles compostos fenólicos fracamente ligados aos polissacarídeos.^{19,61} Por outro lado, as folhas do cultivar SUS foram coletadas parcialmente infectadas, explicando parcialmente os resultados obtidos.

Entre os produtos resultantes da ação hidrolítica de enzimas extracelulares, ocorreu uma maior liberação dos compostos fenólicos nas frações de hemicelulose A (SUS) e em algumas frações da hemicelulose B (B-I, B-II e B-IV, todas SUS), do que nas correspondentes frações do cultivar RE. Já a ação hidrolítica das enzimas intracelulares resultou em uma maior liberação desses compostos nas frações de hemicelulose A e B do cultivar SUS, em relação às mesmas frações RE, concordando com os resultados obtidos na hidrólise ácida total. Isto sugere que algumas plantas respondem com um aumento de compostos fenólicos, derivados do ácido clorogênico, aos processos infecciosos.

Muitas plantas ao sofrerem ataque por um agente patogênico protegem-se elevando, concomitantemente, o conteúdo de certas substâncias, tais como compostos fenólicos,^{64,85,151,166,168,171,}

Muitas plantas ao sofrerem ataque por um agente patogênico, protegem-se elevando, concomitantemente, o conteúdo de certas substâncias, tais como compostos fenólicos, ^{64,85,151,166,168,171,172,219,234,292,316} hidroxiprolina, ^{59,72,101,102,104,165} etileno²⁸⁹ ou, ainda, aumentando a atividade de determinadas enzimas, como a B-1,3-glucanase, ^{1,71} quitinase, ^{1,118,148,230} peroxidases, ²¹⁴ fenil-amonealiase, ¹⁹⁴ ribonuclease e fenol-oxidases. ^{140,214}

Nas análises realizadas, as frações SUS apresentaram apenas uma leve variação no conteúdo de compostos fenólicos, bem como proporções significativas de hidroxiprolina (Tabelas II e IV), confirmando resultados descritos na literatura.

Os compostos presentes em folhas de cafeeiro devem ocorrer, "in vivo", como ácido clorogênico, porém, "in vitro", isto é, nos experimentos realizados, foi detectado como ácido di-O-acetil-cafêico. Sabe-se, no entanto, que o ácido cafêico se origina do clorogênico por hidrólise, conforme a Fig. 27.

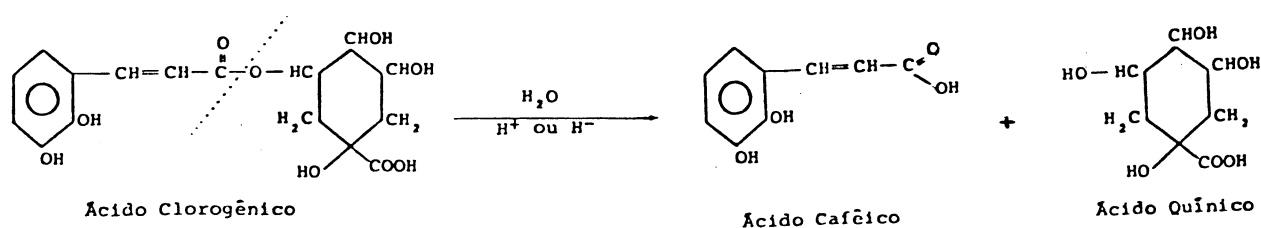


Fig. 27 - Hidrólise ácida ou alcalina do ácido clorogênico.

A caracterização do ácido cafêico (Tabela XI) foi efetuada pelos seguintes processos: t.l.c., solvente g, com padrão de ácido clorogênico, dando o mesmo $R_f = 0,57$; g.l.c., coluna B, o mesmo $T = 10,4$; em g.l.c. a mistura dos dois compostos mostrou um único pico, com $T = 10,4$; o espectro I.V. dos dois compostos foram idênticos (Fig. 29); análise do espectro U.V. dos compostos solubilizados em etanol mostrou deslocamento próximo a 274-275 nm. (Fig. 30); e, espectro de massa e ressonância de protons (Figs. 31 e 32).

TABELA XI

Caracterização do composto fenólico de hemiceluloses B (SUS e RE)

	t.l.c. (Rf)	g.l.c. (T)	U.V. (nm)	I.V. (cm ⁻¹)	N.M.R. ¹ H (p.p.m.)	GC-MS (m/e)
Composto fenólico isolado das Hemiceluloses <u>B</u>	0.57	10.4	274	1060-80, 1220-80, 1380,1440-80, 1720-50,2850, 2940	2223,3990,4165 4220,4471.	57,71,113,149, 167,279
Ácido clorogênico padrão	0.57	10.4	274	1060,1220-50, 1380,1440-80, 1740-60,2850, 2940.	2223,4165,4220, 4471.	57,71,113,149, 167,279

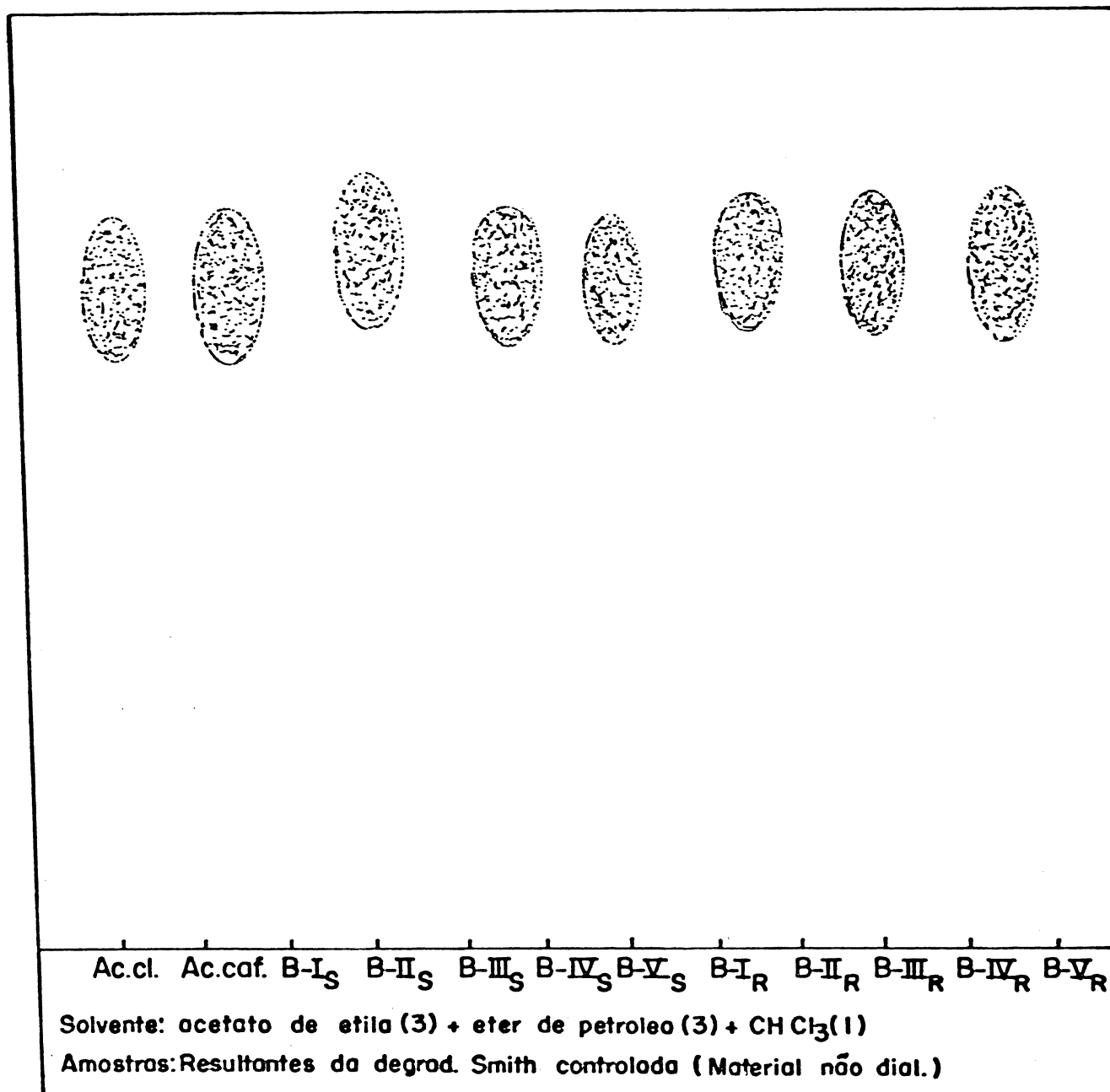


Fig. 28.1 - T.l.c., solvente g , dos compostos fenólicos nos materiais não dialisáveis das frações SUS e RE, resultantes das 3 degradações de SMITH. Padrões: Ácido clorogênico (Ac.cl.) e ácido cafêico (Ac.caf.), submetidos a igual tratamento.

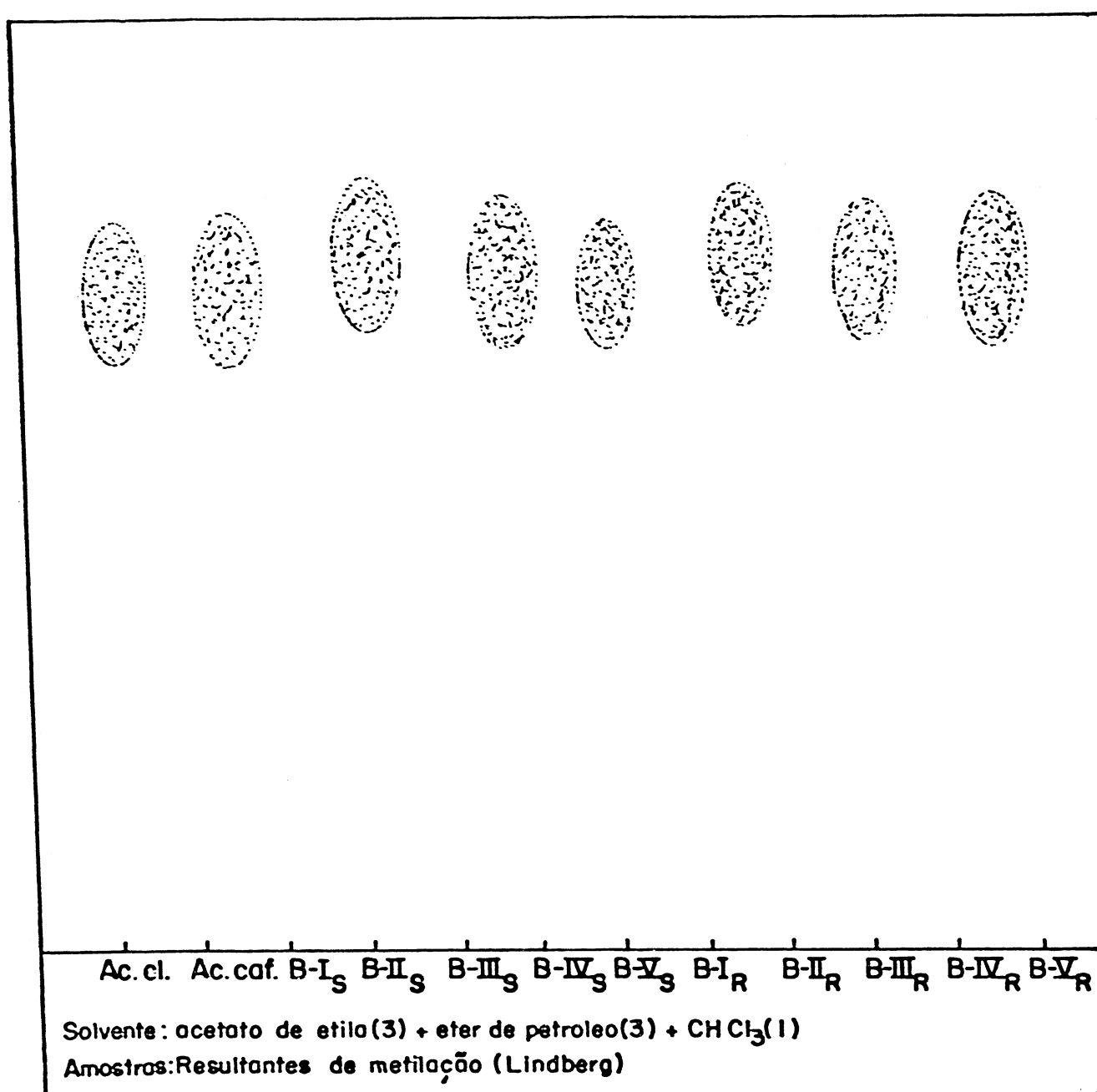


Fig. 28.2 - T.l.c., solvente g , dos compostos fenólicos nos materiais resultantes da metilação (3 HAWORTH e 1 HAKOMORI) e hidrôlise seg. LINDBERG. Padrões: Ácido clorogênico (Ac.cl.) e ácido cafêico (Ac.caf.), submetidos a igual tratamento.

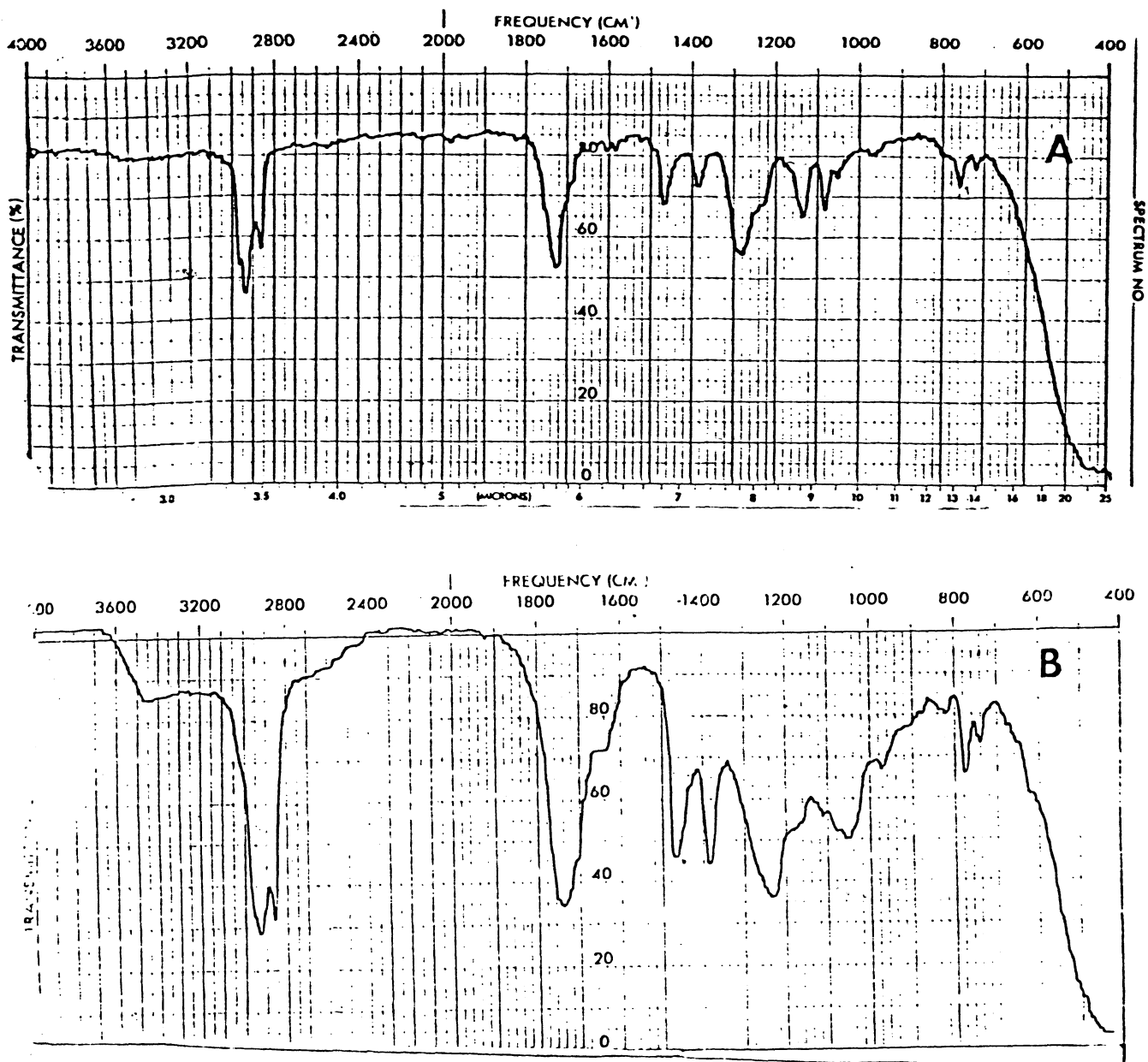


Fig. 29.1 - Espectro infra-vermelho do composto fenólico isolado das frações hemicelulósicas SUS e RE.

A - Após 3 sucessivas oxidações com NaIO_4 , hidrólise, redução com NaBH_4 e acetilação.

B - Após hidrólise com H_2SO_4 a 72%, por 2 h. temp. ambiente, diluição a 8% e refluxo a 100°C , 5 h. Redução com NaBH_4 e acetilação.

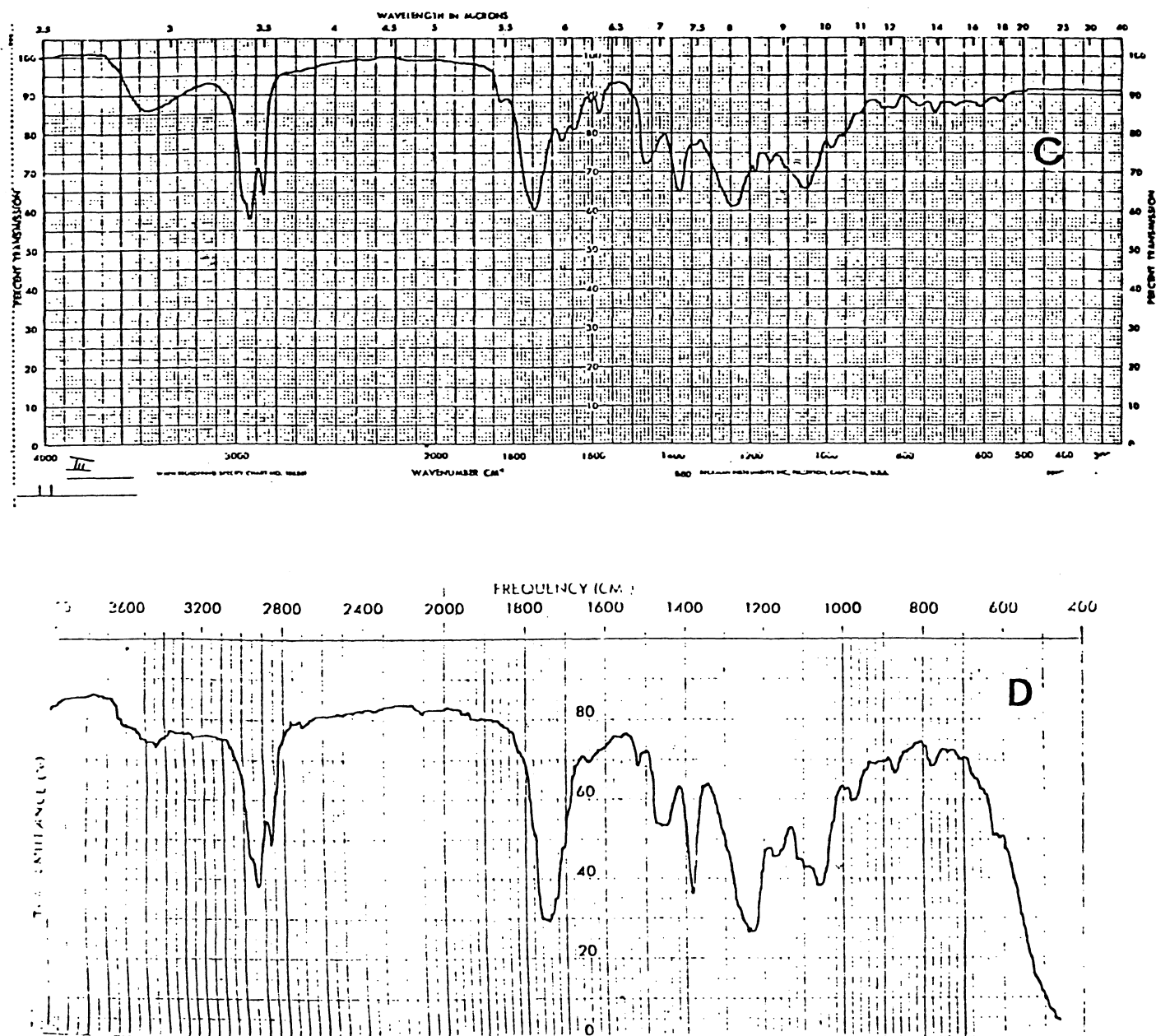


Fig. 29.2 - Espectro infra-vermelho do composto fenólico isolado das frações hemicelulósicas SUS e RE.

C - Após hidrólise com $\text{Ba}(\text{OH})_2$ e separação em coluna de Bio Gel P-2, com eluição em CH_3COOH 0,1N. Os eluatos foram submetidos a hidrólise alcalina com redução simultânea e acetilados.

D - Padrão de ácido clorogênico submetido a idênticos tratamentos e analisado concomitantemente, dando sempre as mesmas absorções.

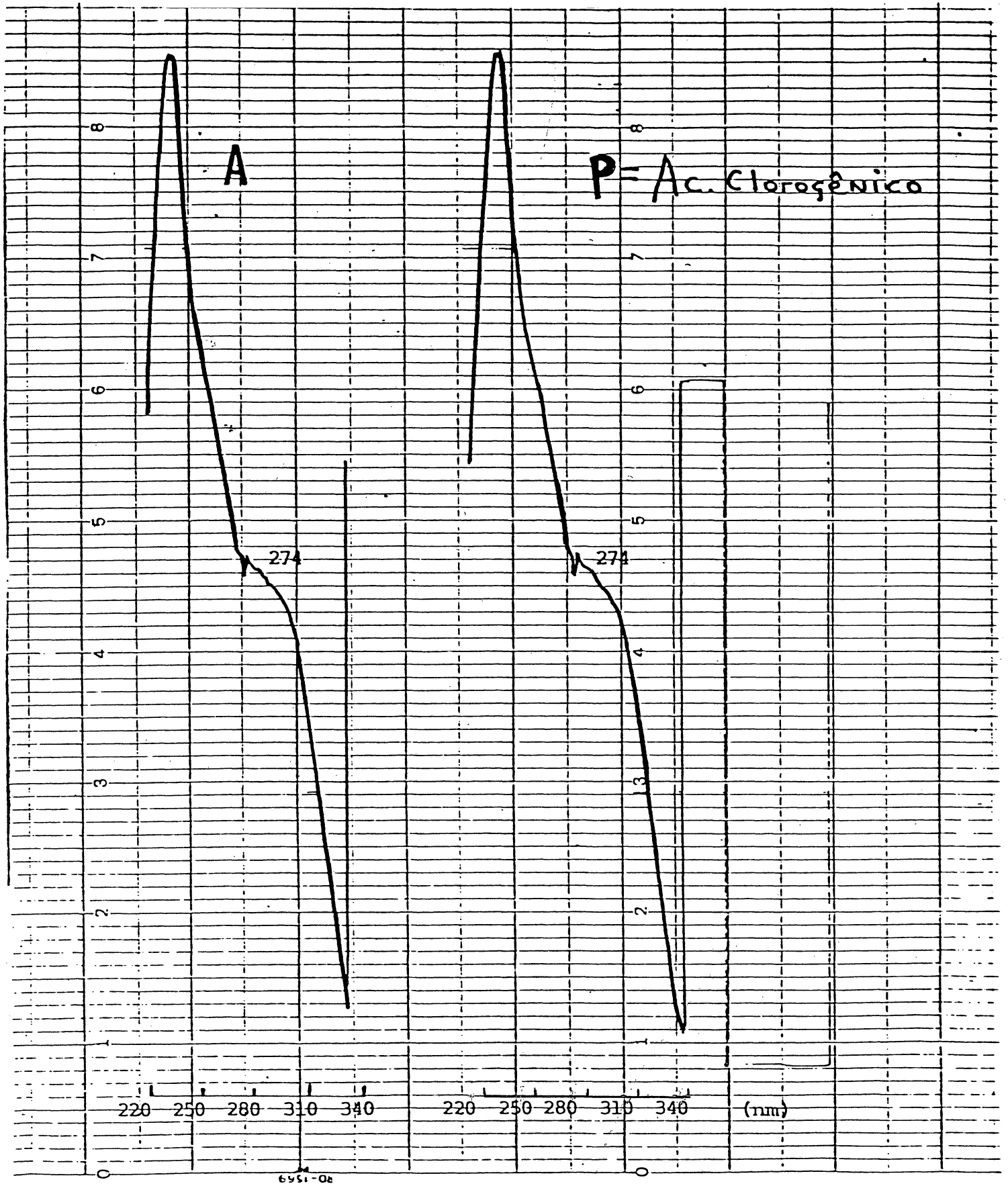


Fig. 30 - Espectro ultra-violeta do derivado de ácido clorogênico isolada da fração B-III(SUS), após 3 sucessivas oxidações com NaIO_4 , hidrólise, redução com NaBH_4 e acetilação. O padrão (P) de ácido clorogênico foi tratado nas mesmas condições que a amostra (A) e analisado paralelamente.

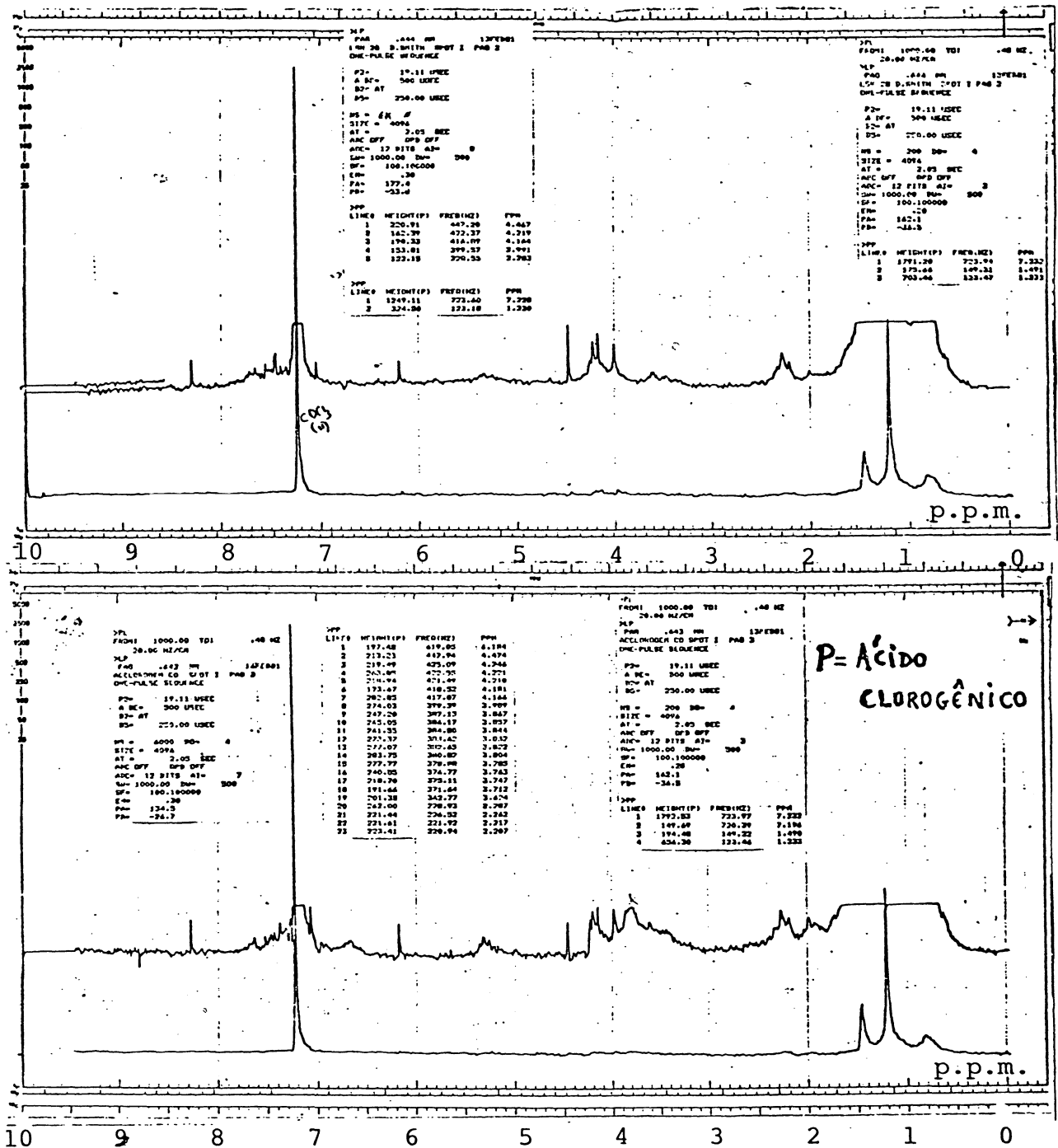


Fig. 31 - Ressonância nuclear magnética protônica do derivado de ácido clorogênico isolado da fração B-III(SUS), após 3 sucessivas oxidações com NaIO₄, hidrólise, redução com NaBH₄, acetilação e isolamento por cromatografia preparativa. O padrão (P) de ácido clorogênico foi tratado nas mesmas condições e analisado paralelamente.

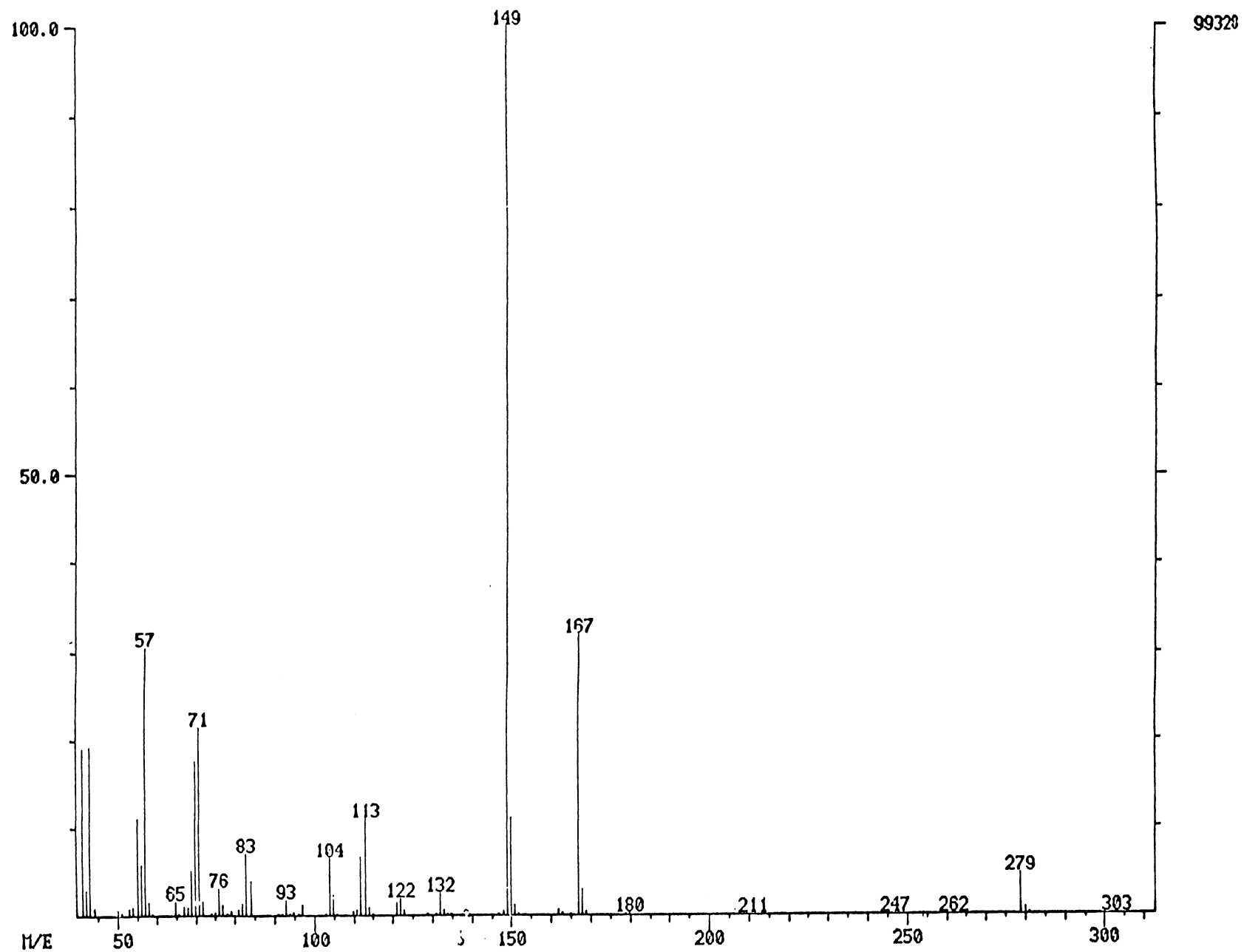


Fig. 32.1 - Fragmentação de massa do derivado de ácido clorogênico isolado da fração B-III (SUS), resultante de 3 sucessivas oxidações com NaIO_4 , hidrólise, redução, acetilação e isolamento em cromatografia preparativa.

BASE LIST
DATA: CE18PG81 #1579 BASE ME: 57
RIC: 44688.

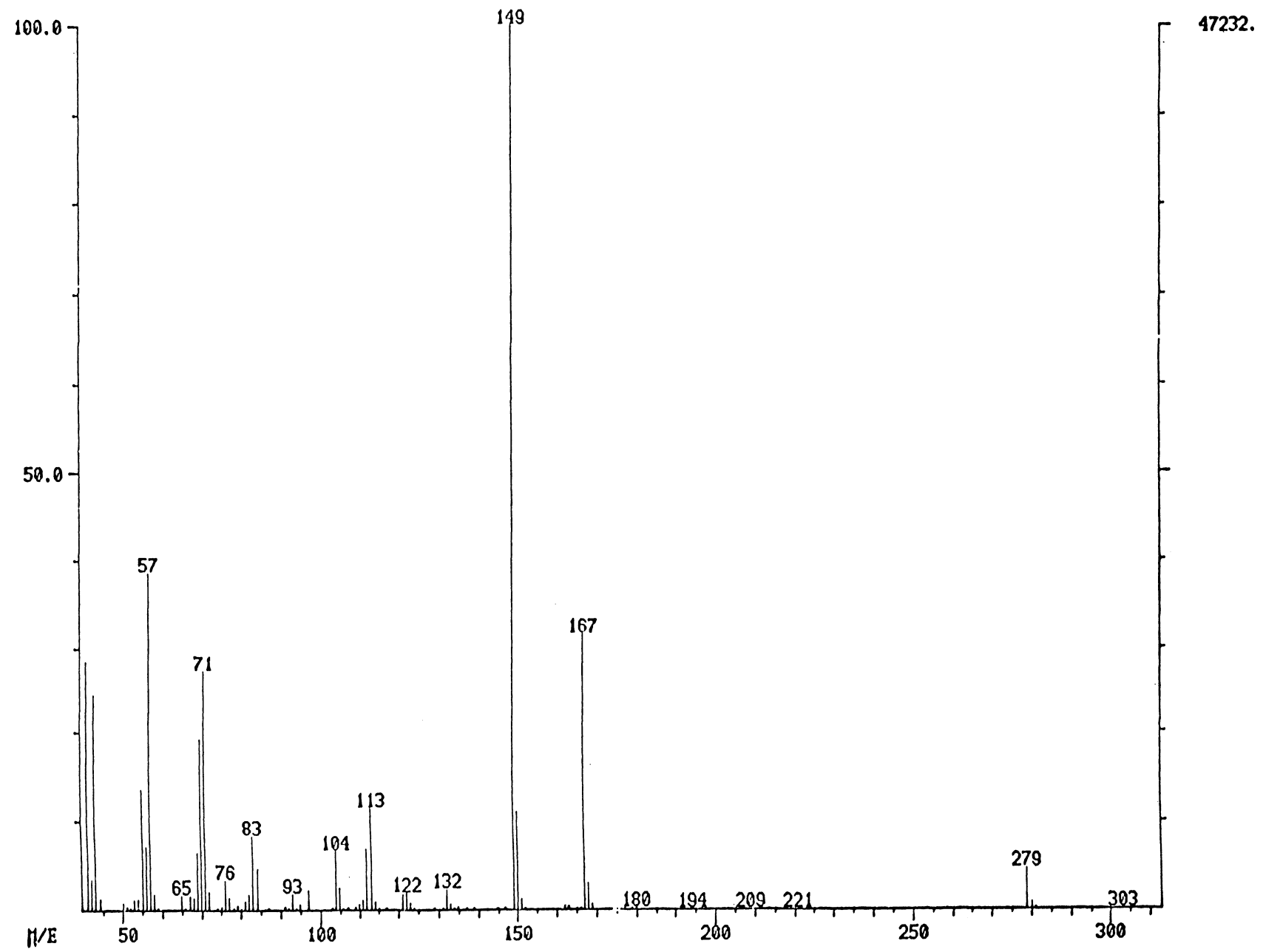


Fig. 32.2 - Fragmentação de massa do derivado de ácido clorogênico isolado da fração B-I (SUS), resultante da hidrólise com H_2SO_4 a 72%, redução, acetilação e isolamento em cromatografia preparativa.

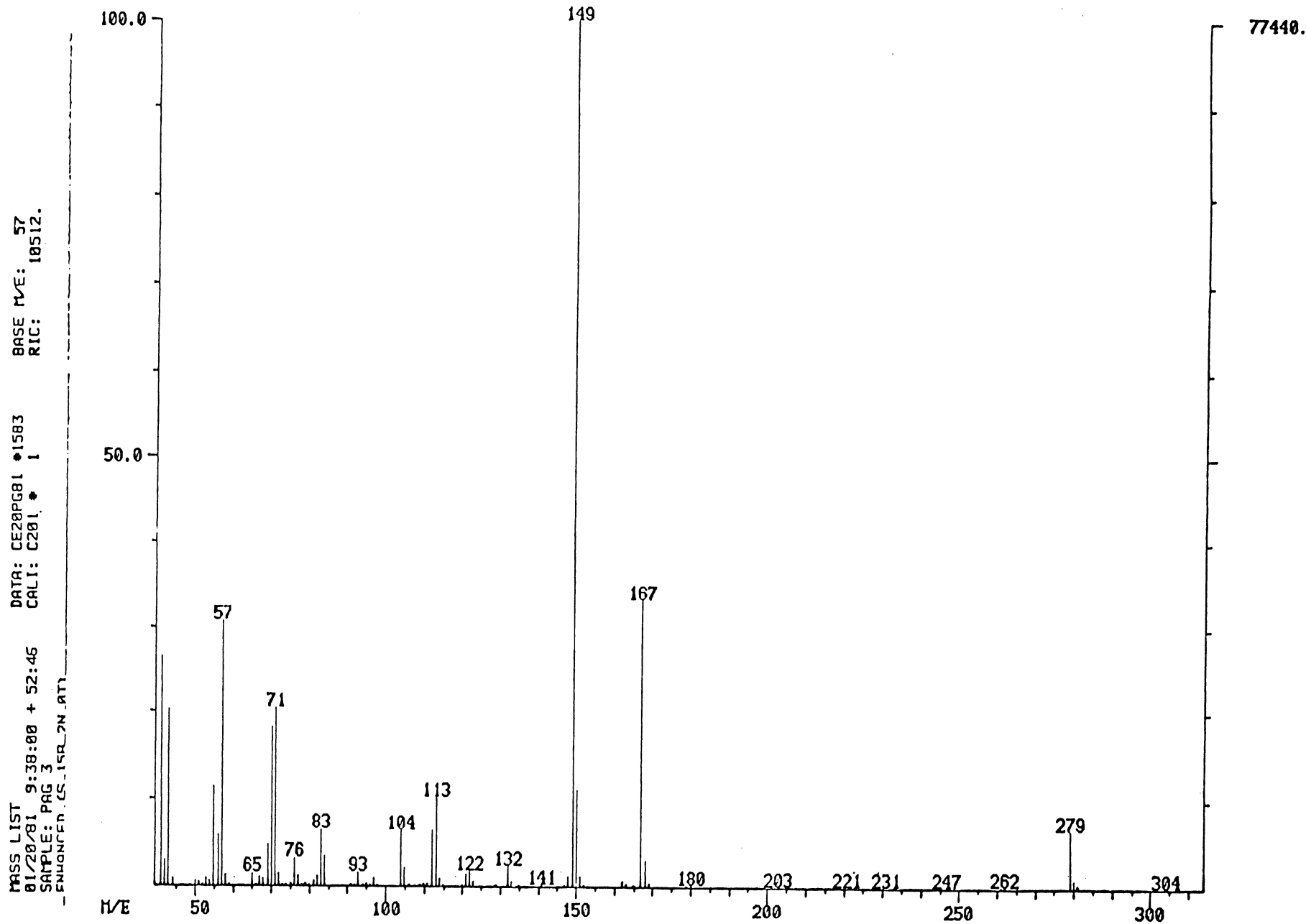


Fig. 32.3 - Fragmentação de massa do ácido clorogênico submetido aos mesmos tratamentos das frações B-I e B-III, (SUS). Espectros semelhantes foram obtidos nas 2 circunstâncias.

Através de 3 degradações sucessivas de SMITH observou-se que uma parte do ácido clorogênico permanecia ligada a um oligossacarídeo não totalmente oxidado pelo periodato (Fig. 28.1), já que a parte livre da molécula desse composto deve ter sido eliminada após extração exaustiva com uma mistura de metano-clorofórmio (1:1). Entre os produtos de hidrólise dos derivados metilados, também foi detectado esse mesmo composto (Tabela V e Fig. 28.2). Isso leva a supor que o mesmo liga-se à molécula de açúcar por uma união muito forte, provavelmente, por uma ligação do tipo O-glicosídica ou do tipo eter. Justifica-se isso pelo fato de que o referido composto, além de ter sido submetido, inicialmente, a uma extração alcalina com KOH a 24%, foi posteriormente submetida à ação do periodato (3 x) e, por último, à metilação em meio fortemente básico (NaOH a 40% e metilsulfinilcarbanion). Mesmo após esses tratamentos, os compostos fenólicos ainda permaneceram ligados a polissacarídeos.

MORRISSON²⁰⁷ e HARTLEY¹²⁶ identificaram, todavia, ligações covalentes lábeis a álcali entre fenóis e carboidratos, provavelmente do tipo ester.

Além desses tipos, podem ocorrer também ligações mais fracas do tipo pontes de H, detectadas por LOOMIS & BATTLE¹⁸³ e por SABIR et al.²⁴⁶ Este últimos, observaram que em girassol, uniam-se por pontes de H à proteínas de baixo peso molecular.

WENZEL²⁹⁸ considerou o resíduo insolúvel obtido por digestão da fração hemicelulósica de folhas de cafeeiro com H₂SO₄ a 72% como sendo lignina ligada à polissacarídeos da parede celular. Hoje, sabe-se que a maior parte desse composto é formado por um derivado fenólico de ácido clorogênico. WENZEL encontrou para esse composto uma absorção em torno de 280nm, no espectro de U.V., se-

melhante ao aqui encontrado (274nm), para composto fenólico de ácido clorogênico. O referido composto deu a reação de LOWRY positiva.

Na hidrólise ácida parcial das frações polissacarídicas um derivado fenólico identificado por g.l.c. na forma de ácido cafêico acetilado, foi isolado como componente das frações de oligossacarídeos ácidos separadas em coluna de resina AG1 - X-10 (AcO^-), Tabela III.

É provável que compostos fenólicos derivados de ácido clorogênico atuem como um dos fatores de resistência em ferrugem de café, inibindo a ação das enzimas extra e intracelulares, já que muitos derivados desse composto foram isolados como inibidores da germinação de esporos de H. vastatrix.^{85,96,211,212,272}. Esse efeito inibitório do composto fenólico sobre as enzimas, possivelmente, explica a queda brusca da curva de hidrólise observada nas Figs. 24 e 25.

Uma outra função atribuída aos compostos fenólicos seria de servirem como pontes de ligação entre moléculas de polissacarídeos e glicoproteínas na parede celular.^{5,303}

A análise química das 10 frações hemicelulósicas isoladas mostrou que possuem estrutura molecular muito ramificada e complexa. Os resultados da análise enzimática dessas frações, faz supor, que, principalmente as hemiceluloses contidas em B-I(SUS) e B-V(SUS), são as mais utilizadas pelo fungo da ferrugem como fonte de carbono e que os monossacarídeos de escolha são galactose, glucose, arabinose e xilose (Tabelas IX e X e Figs. 20 a 23 e 26).

As constatações sobre a constituição das hemiceluloses B da folha de cafeeiro, aliadas às da hidrólise enzimática, permitem concluir, sem desconsiderar outros fatores, que, possivelmente, a susceptibilidade à infecção está relacionada com a estrutura

menos ramificada da molécula, com a presença de aminoaçúcares (2-amino-2-deoxi-D-galactose), a um menor conteúdo em galactose e um aumento dos compostos fenólicos.

4 - CONCLUSÕES

- 1 - As hemiceluloses B, submetidas aos processos analíticos renderam 10 frações polissacarídicas, 5 de cultivar SUS e 5 de cultivar RE, que foram identificadas como glucoarabinoxilanas (B-I, SUS e RE; B-IV, SUS e RE), arabinoglucoxilanas (B-II, SUS e RE), arabinoxiloglucanas (B-III, SUS e RE; B-IV, SUS) e arabinogalactoxiloglucanas (B-V, RE).
- 2 - Constatou-se que todas as frações hemicelulósicas são altamente ramificadas possuindo segmentos lineares, em configuração β , formados por unidades de D-glucose, ligadas através de 1 \rightarrow 4. Além desses segmentos, em todas as frações ocorrem segmentos lineares formados por unidades de D-xilose, unidas através 1 \rightarrow 4. Ainda nesses polímeros verificou-se a presença de pontos de ramificação em C-6, C-3 e C-4, indicados pela ocorrência de 2,3-di-O-metil-D-glucose e de 2,6-di-O-metil-D-galactose entre os derivados metilados; e, também, pontos de ramificação por unidades de D-xilose, indicados pela presença de 3-O-metil-D-xilose, entre os produtos metilados hidrolisados.
- 3 - As análises efetuadas indicaram que as frações hemicelulósicas, SUS e RE, são estruturalmente muito complexas e que as do cultivar RE são mais ramificadas.

- 4 - Todas as frações hemicelulósicas apresentaram ácidos urônicos que, após isolamento e análises, identificou-se como ácido 4-O-metilglucurônico e ácido glucurônico. Esses ácidos apresentaram uma significativa variação de teores nos cultivares SUS e RE, da fração B-I. A variação nas demais frações foi pequena, considerando-se os dois cultivares. Através das análises por metilação desses ácidos urônicos verificou-se que encontram-se ligados em C-2 da xilose, em C-4 da arabinose e em C-2 da ramnose.
- 5 - O aminoaçúcar encontrado somente nas frações SUS, foi identificado como 2-deoxi-D-galactose. Isto pode servir como um provável caráter de diferenciação entre cultivares SUS e RE das frações hemicelulósicas das folhas de cafeeiro.
- 6 - Na degradação enzimática observou-se uma maior atividade hidrolítica nas enzimas extracelulares.
- 7 - As hidrólises enzimáticas realizadas demonstraram que a ação da enzima ocorre preferencialmente e pela ordem nos polímeros constituídos por glucose, galactose, arabinose e xilose.
- 8 - As frações hemicelulósicas mais utilizáveis pelo fungo da ferrugem como fonte de carbono foram, principalmente, as B-I e B-IV, ambas do cultivar SUS.
- 9 - Compostos fenólicos derivados do ácido clorogênico, ocorreram em todas as frações hemicelulósicas, predominando no cultivar SUS. Tais compostos, provavelmente, estão envolvidos no processo infeccioso.

- 10 - Os compostos fenólicos acham-se unidos a polissacarídeos das frações hemicelulósicas B, por uma ligação muito forte do tipo éter ou do tipo glicosídica, pois permaneceu intacta após tratamento com ácido e com álcali forte.
- 11 - As análises realizadas permitiram a identificação do componente fenólico como sendo o ácido di-0-acetilcafêico.
- 12 - Peptidoglicanas foram detectadas em 3 frações hemicelulósicas do cultivar SUS: B-I, B-II e B-IV.
- 13 - Em peptidooligossacarídeos isolados da fração B-I, SUS, identificou-se a presença de uma ligação tipo 0-glicosídica entre o C-1 da arabinose (2,4-di-0-metil-L-arabinose) e o C-4 da hidroxiprolina (4-0H-L-prolina).

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABELES, F.B.; BOSSHART, R.P.; FORRENCE, L.E. & HABIG, W.H. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. Plant Physiol., 47:129-34, 1971
- 2 ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R. & SMITH, F.A. New procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. J.Am.Chem.Soc., 74:4970-1, 1952.
- 3 ADAMS, G.A. Constitution of a polyuronide hemicellulose from wheat leaf. Canad.J.Chem., 32:186-94, 1954.
- 4 _____. Acid hydrolysis of weak linkages. In: WHISTLER, R.L. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1965. v.5, p.285-7.
- 5 AKIYAMA, Y. & KATO, K. Hydroxyproline arabinosides from suspension-cultured Tobacco cell wall. Agr.Biol.Chem., 40(12): 2343-8, 1976.
- 6 _____. Structure of hydroxyproline-arabinoside from Tobacco cells. Agr.Biol.Chem., 41(1):79-81, 1977
- 7 _____. Methylation analysis of extracellular polysaccharides from suspension-cultured cells of Nicotiana tabacum. Phytochemistry, 21(6):1325-9, 1982.
- 8 _____. An arabinoxyloglucan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured Tobacco cells. Phytochemistry, 21(8):2112-4, 1982.
- 9 AKIYAMA, Y.; EDA, S. & KATO, K. An arabinogalactan-protein from the leaves of N. tabacum. Agr.Biol.Chem., 46(5):1395-7, 1982.
- 10 ALBERSHEIM, P.; JONES, T.M. & ENGLISH, P.D. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. Annu.Rev. Phytopathol., 7:171-94, 1969.
- 11 ALBERSHEIM, P. & ANDERSON, R.J. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 68(8):1815-9, 1971
- 12 ALBERSHEIM, P. & ANDERSON-PROUTY, A.J. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. Annu.Rev.Plant.Physiol., 26:31-52, 1975.

- 13 ALBERSHEIM, P.; BAUER, W.D.; KEEGSTRA, K. & TALMADGE, K.W. The structure of the wall of suspension-cultured sycamore cells. In: LOEWUS, F. Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. New York, Academic Press, 1973. p.117-47.
- 14 ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. Scient. Am., 232:80-94, 1975.
- 15 _____. The primary cell wall. In: BONNER, J. & VARNER, J.E. Plant Biochemistry. 3rd ed. New York, Academic Press. 1976. p.266-71.
- 16 ALLEN, P.J. Specificity of the cis-isomers of inhibitors of uredospore germination in the rust fungi. Proc.Nat. Acad.Sci., 69(12):3497-500, 1972.
- 17 ALLEN, A.K. & NEUBERGER, A. The purification and properties of the Lectin from potato tubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein. Biochem.J., 135:307-14, 1973.
- 18 ALLEN, A.K.; DESAI, N.N.; NEUBERGER, A. & CREETH, J.M. Properties of potato Lectin and the nature of its glycoprotein linkages. Biochem.J., 171:665-74, 1978.
- 19 AMORIM, H.V.; ALVARES, M.L.M.; LOPES, C.R.; CARVALHO, A. & MONACO, L.C. Análise de compostos fenólicos em folhas de cafeeiros resistentes e susceptíveis à Hemileia vastatrix. Turrialba, 28(1):57-60, 1978.
- 20 ANDERSEN, S. & WOLD, J.K. Water-soluble glycoprotein from Urtica dioica leaves. Phytochemistry, 17(11):1875-7, 1978.
- 21 ANTONOPOULOS, C.A. A modification for the determination of sulphate in mucopolysaccharides by the benzidine method. Acta Chem.Scand., 16:1521-2, 1962.
- 22 ARGANDONA, V.H.; LUZA, J.G.; NIEMEYER, H.M. & CORCUERA, L. Role of hidroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. Phytochemistry, 19(8):1665-8, 1980.
- 23 ARTURSON, G. & GRANATH, K. Dextrans as test molecules in studies of the functional ultrastructure of biological membranes. Clin.Chem.Acta, 37:309-22. 1972.
- 24 ASHFORD, D.; DESAI, N.N.; ALLEN, A.K.; NEUBERGER, A.; O'NEILL, A. & SELVANDRAN, R.R. Structural studies of the carbohydrate moieties of lectins from potato tubers and thorn-apple seeds. Bioch.J., 201:199-208, 1982.
- 25 ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. In: WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S. Adv.Carbohydr. Chem. XIV. New York, Academic Press, 1959, p.429-68.

- 26 _____ . Carbohydrate polymers of plant cell walls. In: LOEWUS, F. Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. New York, Academic Press, 1973. p.95-115.
- 27 ASPINALL, G.O.; HIRST, E.L.; MOODY, R.W. & PERCIVAL, E.G.V. The hemicelluloses of Esparto grass (Stipa tenacissima L.) The arabinose-rich fraction. J.Chem.Soc., 329:1631-4, 1953.
- 28 ASPINALL, G.O. & MEEK, E.G. The constitution of a wheat-straw hemicellulose. J.Chem.Soc., 744:3830-4, 1956.
- 29 ASPINALL, G.O.; MOLLOY, J.A. & CRAIG, J.W.T. Extracellular polysaccharides from suspension-cultured sycamore cells. Canad.J.Biochem., 47:1063-70, 1969.
- 30 ASPINALL, G.O. & WILKIE, K.C.B. The constitution of an Oat-straw xylan. J.Chem.Soc., 221:1072-6, 1956.
- 31 ASPINALL, G.O. Gums and mucilages. In: WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S. Adv.Carbohydr.Chem. XXIV. New York, Academic Press, 1969. p.272-9.
- 32 ASPINALL, G.O. Pectinas, plant gums and other plant polysaccharides. In: NORTON, P. The carbohydrates - Chemistry and Biochemistry. New York, Academic Press, 1970, p.531-2.
- 33 ASPINALL, G.O.; KRISHNAMURTHY, T.N. & ROSELL, K.G. A fucogalactoxyloglucan from rapeseed hulls. Carbohydr.Res., 55:11-9, 1977.
- 34 AURIOL, M.P. & TOUZÉ, A. Sur les polyosides des parois cellulaires d'organes végétaux sains et parasités. Physiol. Vég., 8(2):263-75, 1970.
- 35 AURIOL, M.P. Polyosides hydrolases et pathogène dans l'anthraxose des Cucurbitacées. C.R.Acad.Sc.Paris, 272:3038-40, 1971.
- 36 BAILEY, J.A. & DEVERALL, B.J. Effect of bacterial inoculation of bean and pea leaves on the accumulation of phaseolin and pisatin. Physiol.Plant Path., 1(2):434-49, 1971.
- 37 BARKER, S.A.; BOURNE, E.J. & WHIFFEN, D.H. Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. In: GLICK, D. Method of Biochemical Analysis. New York, Interscience, 1956. v.3, p.213-45.
- 38 BARKER, S.A.; STACEY, M. & ZWEIFEL, G. The separation of neutral polysaccharides. Chemistry & Industry, (11):330, 1957.
- 39 BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. J.Biol.Chem., 234:466-8, 1959
- 40 BARTNICKI-GARCIA, S. & NICKERSON, W.J. Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. Biochem.Biophys.Acta, 58:102-19, 1962.

- 41 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., 51:174-87, 1973.
- 42 BITANCOURT, A.A. A ferrugem do cafeeiro. O Biológico, 36(2): 31-41, 1970.
- 43 BITTER, T. & MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal.Biochem., 4:330-4, 1962.
- 44 BJØRNDAL, H.; LINDBERG, B. & SVENSSON, S. Mass-spectrometry of partially methylated alditol acetates. Carbohydr.Res., 5:433-40, 1967.
- 45 BJØRNDAL, H.; HELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B. & SVENSSON, S. Gas liquid chromatography and mass-spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. Angew.Chem.int.ed., 9: 610-9, 1970.
- 46 BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. A critical re-examination of problems inherent in compositional analysis of hemicelluloses by gas-liquid chromatography. Carbohydr.Res., 14:375-87, 1970.
- 47 BLAKE, J.D.; MURPHY, P.T. & RICHARDS, G.N. Isolation and A/B classification of hemicelluloses. Carbohydr.Res., 16:49-57, 1971.
- 48 BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. An examination of some methods for fractionation of plant hemicelluloses. Carbohydr. Res., 17:253-68, 1971.
- 49 _____ . Evidence for molecular aggregation in hemicelluloses. Carbohydr.Res., 18:11-21, 1971.
- 50 BOAS, N.F. Method for the determination of hexosamines in tissues. J.Biol.Chem., 204:553-63, 1953.
- 51 BOUNDY, J.A.; WALL, J.S.; TURNER, J.E.; WOYCHIK, J.H. & DIMLER, R.J. A mucopolysaccharide containing hydroxyproline from corn pericarp. J.Biol.Chem., 242:2410-5, 1967.
- 52 BRASIL. Instituto Brasileiro do Café. Cultura do Café no Brasil. 4a. ed. Rio de Janeiro, IBC, 1981. 503p.
- 53 BROWN, R.G. & KIMMINS, W.C. Hypersensitive resistance. Isolation and characterization of glycoproteins from plants with localized infections. Can.J.Bot., 51:1917-22, 1973.
- 54 BROWN, R.G.; KIMMINS, W.C. & LINDBERG, B. Structural studies of glycoproteins from Phaseolus vulgaris. Acta Chem.Scand., B29:843-52, 1975.
- 55 BROWN, R.G. & KIMMINS, W.C. Protein-polysacchride linkages in glycoproteins from Phaseolus vulgaris. Phytochemistry, 17 (1):29-33, 1978.

- 56 _____ . Linkage analysis of hydroxyproline poor glycoprotein from Phaseolus vulgaris. Plant Physiol., 63:557-61, 1979.
- 57 BUCHALA, A.J.; FRASER, C.G. & WILKIE, K.C.B. An acidic galactoarabinoxylano from the stem of Avena sativa. Phytochemistry, 11(9):2803-14, 1972.
- 58 BUCHALA, A.J. Xylans from the tropical grass Panicum maximum. Phytochemistry, 13(10):2185-8, 1974.
- 59 BUCKHOUT, T.J. & CURTIS, R.W. Inhibition of malformin activity by hydroxyproline and restoration by proline. Nature, 26:435-6, 1976.
- 60 BURKE, D.; KAUFMAN, P.; MCNEIL, M. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls VI. A survey of the walls of suspension-cultured Monocots. Plant Physiol., 54:109-15, 1974.
- 61 CARELLI, M.L.C.; LOPES, C.R. & MONACO, L.C. Chlorogenic acid content in species of Coffea and selections of C. arabica. Turrialba, 24(4):398-401, 1974.
- 62 CARVALHO, A. Esse projeto não pode morrer. Rev.do Comércio de Café, 64(694):6-10, 1984. Entrevista.
- 63 CARPITA, C.N. Cell wall polymers of the lettuce embryonic axis. Phytochemistry, 21(7):1563-6, 1982.
- 64 CASTILLO, J.Z. & QUICENO, G.H. Comparacion de lineas de Coffea arabica L. por su resistencia a Ceratocystis fimbriata (Ell. Halst.) Hunt. Cenicafé, 21:95-104, 1970.
- 65 CHAVES, G.M. O catimor. Agropecuário, 24-29. Fev./1978. Entrevista.
- 66 CHAVES, G.M.; CRUZ, J.; CARVALHO, M.G.; MATSUOKA, K.; COELHO, D.T. & SHIMOYA, C. A ferrugem do cafeeiro. Seiva, 30:1-75, 1970.
- 67 CHRISPEELS, M.J. Synthesis and secretion of hydroxyproline containing macromolecules in Carrots. I-Kinetic analysis. Plant Physiol., 44:1187-93, 1969.
- 68 _____ . Synthesis and secretion of hydroxyproline-containing macromolecules in Corrots. II-In vive conversion of peptidyl proline to peptidyl hydroxyproline. Plant Physiol., 45:223-7, 1970.
- 69 CHURMS, S.C. Gel chromatography of carbohydrates. In: WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S. Adv. Carbohydr.Chem.XXV, New York, Academic Press, 1970. p.13-51.
- 70 COREY; E.J. & CHAYKOVSKY, M. Methylsulfinycarbanion. J.Am.Chem.Soc., 84:866-7, 1962.
- 71 CLARKE, A.E. & STONE, B.A. β -1,3-Glucan hidrolases from the grape vine (Vitis vinifera) and other plants. Phytochemistry, 1(1):75-88, 1962.

- 72 CLARKE, J.A.; LISKER, N.; LAMPORT, D.T.A. & ELLINGBOE, A.H. Hydroxyproline enhancement as a primary event in the successful development of Erysiphe graminis in Wheat. Plant Physiol., 67:188-9, 1981.
- 73 CLAUS, E.P. & TYLER, V.E. Farmacognosia. Buenos Aires, Ed. El Ateneo, 1968. p.310.
- 74 CLELAND, R. & OLSON, A.C. Metabolism of free hydroxyproline in Avena coleoptiles. Biochemistry, 6:32-6, 1967.
- 75 CLELAND, R. Inhibition of cell elongation in Avena coleoptile by hydroxyproline. Plant Physiol., 42:271-4, 1967.
- 76 _____. Distribution and metabolism of protein-bound hydroxyproline in an elongating tissue, the Avena coleoptile. Plant Physiol., 43:865-70, 1968.
- 77 CORRÊA, J.B.C. Metilação. In: Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos. Curitiba, 1971. p.39-49. Monografia didática.
- 78 CORRÊA, J.B.C.; GOMES, L.S. & GEBARA, M. Structural features of hemicellulose A from the stem of Mimosa bracaatinga. Carbohydr.Res., 60:337-43, 1978.
- 79 COURT, G.J. & TAYLOR, I.E.P. Isolation and partial characterization of a proteoglycan from the red alga Laurentia spectabilis. Phytochemistry, 18(3):411-4, 1979.
- 80 COURTOIS, J.É.; DIZET, P. & ROBIC, D. Étude complémentaire de la structure de trois galactoxyloglucanes (amyloïdes) de graines. Carbohydr.Res., 49:439-49, 1976.
- 81 CRUICKSHANK, I.A.M.; BIGGS, D.R. & PERRIN, D.R. Phaseolin and phaseollidin relationships in infection-droplets on endocarp of P. vulgaris. Physiol.Plant Pathol., 4:261-76, 1974.
- 82 DANISHEFSKY, I.; WHISTLER, R.L. & BETTELHEIM, F.A. Introduction to Polysaccharides Chemistry. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry. New York, Academic Press, v. 2A, 1970. p.375-412.
- 83 DARVILL, J.E.; MCNEIL, M.; DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. Structure of Plant Cell Walls. XI-Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. Plant Physiol., 66:1135-9, 1980.
- 84 DASHEK, W.V. Synthesis and transport of hydroxyproline-rich components in suspension cultures of sycamore-maple cells. Plant Physiol., 46:831-8, 1970.
- 85 DAVET, P. & RAVISÉ, A. Inhibition du Colletotrichum coccodes, du Pyrenochaeta lycopersici et de leurs enzymes pectinolytiques par les substances élaborées chez quelques Lycopersicon en réaction à l'infection par le complexe parasitaire des racines. C.R.Acad.Sc.Paris, 282:1351-4, 1976.

- 86 DELMOTTE, F.; KIEDA, C. & MONSIGNY, M. Protein-sugar interaction: purification by affinity chromatography of Solanum tuberosum agglutinin (Sta-lectin). Febes Letters, 53 (3):324-30, 1975.
- 87 DENT, C.E. A study of the behavior of some sixty amino-acids and other ninhydrin-reacting substances on phenol-collidine filter-paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in Biological fluids. Biochem.J., 43:169-80, 1948.
- 88 DIAS, R.M.; AMORIM, H.V.; ESQUES, A. & CARVALHO, A. Resultados preliminares sobre o mecanismo de resistência do cafeeiro à H. vastatrix. Resumos do V Cong. Bras. Pesquisas Cafeeiras, Guarapari, IBC, out.1977.
- 89 DIETRICH, S.M.C. Comparative study of hyphal wall components of Oomycetes: Saprolegniaceae and Pythiaceae. An.Acad.Bras. Ciênc., 47(1):155-62, 1975.
- 90 DISCHE, Z. Color reactions of Hexosamines. In: WHISTLER, R. L. & WOLFROM, M.L. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1962. v.1, p.507-12.
- 91 DOROSO, N.; ODEBRECHT, S. & CORRÊA, J.B.C. Some aspects of the chemical structure of the hemicellulose B from the stem of Mimosa bracaatinga. Arg.Biol.Tecnol., 23(3):257-63, 1980.
- 92 DOWNS, F. & PIGMAN, W. Determination of O-acetyl groups by the Hestrin method. In: WHISTLER, R.L. & BEMILLER, J.N. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1976. v.7, p.241-3.
- 93 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal.Chem., 28:350-6, 1956.
- 94 DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed polysaccharides on cellulose acetate. Can.J.Chem., 46:3079-84, 1968.
- 95 DYER, J.R. Use of Periodate Oxidations in Biochemical Analysis. In: GLICK, D. Methods of Biochemical Analysis. New York, Interscience, 1956. vol.3, p.111-52.
- 96 ECHANDI, E. & FERNANDEZ, C.E. Relación entre el contenido de ácido clorogénico y la resistencia a la llaga macana o cáncer de los cafetos causados por Ceratocystis fimbriata. Turrialba, 12(2):87-90, 1962.
- 97 EDA, S. & KATO, K. An arabinoxyloglucan isolated from the midrib of the leaves of N. tabacum. Agr.Biol.Chem., 42(2): 351-7, 1978.
- 98 ENGLER, A. Syllabus der Pflanzenfamilien. 12 ed. Berlin, Gerbruder Borntraeger, 1954. p.170-91.

- 99 ENGLISH, P.D.; JURALE, J.B. & ALBERSHEIM, P. Host-Pathogen interactions. Plant Physiol., 47:1-6, 1971
- 100 ESELYN, W.E.; KIRK, T.K. & EFFLAND, M.J. Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. Phytopathology, 65:473-6, 1974.
- 101 ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Influence d'une maladie parasitaire sur la teneur en hydroxyproline des parois cellulaires d'épicotyles et pétioles de plantes de Melon. C.R.Acad.Sc.Paris, 276:525-8, 1973.
- 102 ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. & MAZAU, D. Effect of a fungal disease on extensin the plant cell wall glycoprotein. J.Exp.Bot., 25:509-13, 1974.
- 103 ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; LAFFITE, C.; MAZAU, D.; TOPPAN, A. & TOUZÉ, A. Cell surfaces in plant microorganism interactions. II-Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. Plant Physiol., 64:320-6, 1979.
- 104 ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. & LAMPORT, D.T.A. Cell surfaces in plant microorganism interactions. I-A structural investigation of cell wall hydroxyproline-rich accumulate in fungus infected plants. Plant Physiol., 64:314-9, 1979.
- 105 EVANS, L.V.; CALLOW, M.E.; PERCIVAL, E. & FAREED, V. Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga Rhodella. J.Cell.Sci., 16:1-21, 1974.
- 106 FALCONER, E.L. & ADAMS, G.A. The aldobiuronic acids of hemicellulose B of oat hulls. Can.J.Chem., 34:338-44, 1956.
- 107 FERRI, M.G. Botânica - Morfologia interna das plantas. São Paulo, Melhoramentos, 1970. p.18-26.
- 108 FISHER, M.L.; ANDERSON, A.J. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. VI-A single plant protein efficiently inhibits endopolygalacturonases secreted by C. lindemuthianum and A. niger. Plant Physiol., 51:489-91, 1973.
- 109 FINCHER, G.B.; SAWYER, W.H. & STONE, B.A. Chemical and physical properties of an arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. Biochem.J., 139:535-45, 1974.
- 110 FREITAS, J. Ferrugem chega à Colômbia e traumatiza mercados. Rev. do Comércio de Café, 64(693):39-42, 1984.
- 111 FUCHS, W.H. 1.1 History of physiological Plant Pathology; 1.2 DALY, J.M. Some aspects of host-pathogen interactions; 3.3 GOODMAN, R.N. Physiological and cytological aspects of the bacterial infection process; 4.3 BATEMAN, D.F. & BASHAM, H.G. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes; 5.8 KÜC, J.A. Phytoalexins; 5.9 SCHÖNBECK, F. SCHLÖSSER, E. Performed substances as potential protectants. In: HEITFUSS, R. & WILLIAMS, P.H. Physiological Plant Pathology. New York, Spring Verlag, 1976. v.4, p.1-662.

- 112 GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as Iodine Complexes. Nature, 191:1295-6, 1961.
- 113 _____. Comparison of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families. Phytochemistry, 4(3):631-4, 1965.
- 114 GAILLARD, B.D.E. & BAILEY, R.W. Reaction with iodine of polysaccharides dissolved in strong calcium chloride solution. Nature, 212:202-3, 1966.
- 115 GAILLARD, B.D.E.; THOMPSON, N.S. & MORAK, A.J. The interaction of polysaccharides with iodine. Part I-Investigation of the general nature of reaction. Carbohydr.Res., 11:509-19, 1969.
- 116 GAILLARD, B.D.E. & THOMPSON, N.S. Interaction of polysaccharides with iodine. Part II-The behavior of xylans in different salt solutions. Carbohydr.Res., 18:137-46, 1971.
- 117 GERRIT, H.J.; KLIS, F.M.; WILDT, P.J.M.; HAZENBERG, C.A.M.; BUIJS, J. & STEGWEE, D. Arabinogalactan protein from a crude cell organelle fraction of Phaseolus vulgaris. Plant Physiol., 68:910-3, 1981.
- 118 GLAZER, A.N.; BAREL, A.O.; HOWARD, J.B. & BROWN, D.M. Isolation and characterization of Fig lysozyme. J.Biol.Chem., 244:3583-9, 1969.
- 119 GOLGSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A. & SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R.L. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1965. v.5, p.361-70.
- 120 GOODWIN & MERCER. Introduction to Plant Biochemistry. 2a. ed. Oxford, Pergamon Press, 1983. p.55-78.
- 121 GOULD, S.E.B.; REES, D.A. & WIGHT, N.J. Polysaccharides in germination. Xyloglucans (amyloids) from the cotyledons of white mustard. Biochem.J., 124:47-53, 1971.
- 122 GOWDA, J.P.; GOWDA, D.C. & ANJANEYALU, Y.V. Structure of a new arabinoxylan from the bark of C. iners. Carbohydr.Res., 87:241-8, 1980.
- 123 HALL, J.A. & WOOD, R.K.S. Plant cells killed by soft rot parasites. Nature, 227:1266-7, 1970.
- 124 HADWIGER, L.A.; HESS, S.L. & BROEMBSSEN, S. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase activity and phytoalexin production. Phytopathology, 60:332-6, 1970.
- 125 HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J.Biochem., 55:205-8, 1964.

- 126 HARTLEY, R.D. Carbohydrate esters of ferulic acid as components of cell-walls of L. multiflorum. Phytochemistry, 12 (3):661-5, 1973.
- 127 HARTLEY, R.D.; JONES, E.C. & WOOD, T. Comparison of cell-walls of L. multiflorum with cotton cellulose in relation to their digestion with enzymes associated with cellulolysis. Phytochemistry, 12(4):763-6, 1973.
- 128 _____. Carbohydrates and carbohydrates esters of ferulic acid released from cell walls of L. multiflorum by treatment with cellulolytic enzymes. Phytochemistry, 15(2):305-7, 1976.
- 129 _____. Diferulic acid as a component of cell walls of L. multiflorum. Phytochemistry, 15(5):1157-60, 1976.
- 130 _____. Phenolic components and degradability of cell walls of grass and legume species. Phytochemistry, 16(10):1531-4, 1977.
- 131 HAY, G.W.; LEWIS, B.A. & SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides. In: WHISTLER, R.L. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1965. v.5, p.357-61.
- 132 HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J.Chem.Soc., 107:8-16, 1915
- 133 HEANEY-KIERAS, J. & CHAPMAN, D.J. Structural studies on the extracellular polysaccharides of the red alga P. cruentum. Carbohydr.Res., 52:169-77, 1976.
- 134 HEANEY-KIERAS, J.; RODÉN, L. & CHAPMAN, D.J. The covalent linkage of protein to carbohydrate in the extracellular protein-polysaccharide from the red alga P. cruentum. Biochem.J., 165:1-9, 1977.
- 135 HEATH, M.F. & NORTHCOOTE, D.H. Glycoprotein of the wall of sycamore tissue-culture cells. Biochem.J., 125:953-61, 1971.
- 136 HENDERSON, G.A. & HAY, G.W. The carbohydrates of the leaves of common Barberry (B. vulgaris). The extraction, fractionation and structural studies of selected non-cellulosic polysaccharides. Carbohydr.Res., 23:379-98, 1972.
- 137 HIGHLEY, T.L. Hemicellulases of white and brown-rot fungi in relation to host preferences. Material und Organismen, 11 (1):33-46, 1976.
- 138 HIGUCHI, T.; ITO, Y. & KAWAMURA, I. Para-hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine-ammonia lyase in its formation. Phytochemistry, 6(6):875-81, 1967.
- 139 HIGUCHI, T.; ITO, Y.; SHIMADA, M. & KAWAMURA, I. Chemical properties of milled wood lignin of grasses. Phytochemistry, 6(8):1551-6, 1967.

- 140 HIGNETT, R.C.; ROBERTS, A.L. & CARDER, J.H. The properties of extracellular enzymes of Venturia inaequalis and their association with loss of virulence of the fungus in culture. J.Gen.Microbiol., 110:67-75, 1979.
- 141 HILLESTAD, A.; WOLD, J.K. & PAULSEN, B.S. Structural studies of water-soluble glycoproteins from C. sativa. Carbohydr. Res., 57:135-44, 1977.
- 142 HILLESTAD, A. & WOLD, J.K. Water-soluble glycoproteins from C. sativa (South Africa). Phytochemistry, 16(12):1947-51, 1977.
- 143 HILLESTAD, A.; WOLD, J.K. & ENGEN, T. Water-soluble glycoproteins from C. sativa (Thailand). Phytochemistry, 16(12):1953-6, 1977.
- 144 HILLESTAD, A. Glycoproteins of the opium poppy. Phytochemistry, 19(8):1711-5, 1980.
- 145 HORI, H. & SATO, S. Extracellular hydroxyproline-rich glycoprotein of suspension-cultured Tobacco cells. Phytochemistry, 16(10):1485-7, 1977.
- 146 HSU, D.S. & REEVES, R.E. The structure of Nasturtium amyloid. Carbohydr.Res., 5:202-9, 1967.
- 147 HOUGH, L.; JONES, J.K.M. & WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V-Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J.Chem.Soc., 345:1702-6, 1950.
- 148 HOWARD, J.B. & GAZER, A.N. Papaya lysozyme. J.Biol.Chem., 244(6):1399-409, 1969.
- 149 JACOBS, M. & RAY, P.M. Promotion of xyloglucan metabolism by acid pH. Plant Physiol., 56:373-6, 1975.
- 150 JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, D. & LONN GREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chem. Commun., 8:1-72, 1976.
- 151 JOHNSON, G. & SCHAAL, L.A. Relation of chlorogenic acid to Scab resistance in potatoes. Science, 115:627-9, 1952.
- 152 JOLY, A.B. Botânica - Introdução à taxonomia vegetal. São Paulo, Ed. USP, 1975. p.570-1.
- 153 JONES, R.F. Extracellular mucilage of the red alga P. cruentum. J.Cell.Comp.Physiol., 60:61-4, 1962.
- 154 JONES, T.M.; ANDERSON, A.J. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. IV-Studies on the polysaccharide degrading enzymes secreted by Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Physiol.Plant Pathol., 2:153-66, 1972.

- 155 JOSELEAU, J.P. & BARNOUD, F. Hemicelluloses of young internodes of Arundo donax. Phytochemistry, 13(7):1155-8, 1974.
- 156 _____. Hemicelluloses of Arundo donax at different stages of maturity. Phytochemistry, 14(1):71-5, 1975.
- 157 KABATANAL MAYER'S. Kjeldahl Nitrogen determination. Experimental Imuno Chem., 2a. ed., Illinois, Springfield, 1964. p.476-83.
- 158 KARR, A.L. Isolation of an enzyme system which will catalyse the glycosylation of extension. Plant Physiol., 50:275-82, 1972.
- 159 KATO, Y. & MATSUDA, K. Presence of a xyloglucan in the cell wall of Phaseolus aureus hypocotylus. Plant & Cell.Physiol 17:1185-98, 1976.
- 160 _____. Structure of oligosaccharides obtained by controlled degradation of Mung bean xyloglucan with acid and Aspergillus oryzae enzyme preparation. Agr.Biol.Chem., 44(8):1751-8, 1980.
- 161 _____. Structure of polysaccharide obtained by hydrolysis of Mung bean xyloglucan with Trichoderma viride cellulase. Agr.Biol.Chem., 44(8):1759-66, 1980.
- 162 KATO, Y.; IKI, I. & MATSUDA, K. Cell-wall polysaccharides of immature Barley Plants. II-Characterization of a xyloglucan. Agr.Biol.Chem., 45(12):2745-53, 1981.
- 163 KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K.W.; BAUER, W.D. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. III-A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. Plant Physiol., 51:188-96, 1973.
- 164 KENNEDY, J.F.; SANDHU, J.S. & SOUTHGATE, D.A.T. Structural data for the carbohydrate of Ispaghula husk ex Plantago ovata. Carbohydr.Res., 75:265-74, 1979.
- 165 KIMMINS, W.C. & BROWN, R.G. Effect of a non-localized infection by southern bean mosaic virus on a cell wall glycoprotein from bean leaves. Phytopathology, 65:1350-1, 1975.
- 166 KIRALY, Z. & FARKAS, G.L. Relations between phenol-metabolism and stem rust resistance in wheat. Phytopathology, 52:657-64, 1962.
- 167 KNEE, M. Soluble and wall-bound glycoproteins of apple fruit tissue. Phytochemistry, 14(9):2181-8, 1975.
- 168 KOIKE, S.; IIZUKA, T. & MIZUTANI, J. Determination of caffeic acid in the digestive juice of silkworm larvae and its antibacterial activity against the pathogenic Streptococcus faecalis AD-4. Agr.Biol.Chem., 43(8):1727-31, 1979.

- 169 KOOIMAN, P. On the occurrence of amyloids in plant seeds. Acta Bot. Neerlandica, 9:208-19, 1960.
- 170 _____. The constitution of the amyloid from seeds of Annona muricata. Phytochemistry, 6(12):1665-73, 1967.
- 171 KÜC, J.; HENZE, R.E.; ULLSTRUP, A.J. & QUACKENBUSH, F.W. Chlorogenic acid and caffeic acids as fungistatic agents produced by potatoes in response to inoculation with H. carbonium. J.Amer.Chem.Soc., 78:3123-5, 1956.
- 172 KÜC, J. A biochemical study of the resistance of potato tuber to attack by various fungi. Phytopathology, 47:676-80, 1957.
- 173 LABAVITCH, J.M. & RAY, P.M. Structure of hemicellulosic polysaccharides of Avena sativa coleoptile cell walls. Phytochemistry, 17(5):933-7, 1978.
- 174 LAMPORT, D.T.A. The protein component of primary cell walls. Adv.Bot.Res., 2:151-218, 1965.
- 175 _____. Hydroxyproline-O-glycosidic linkage of the plant cell wall glycoprotein extensin. Nature, 216:1322-4, 1967.
- 176 _____. The isolation and partial characterization of hydroxyproline-rich glycopeptides obtained by enzymic degradation of primary cell walls. Biochemistry, 8:1155-63, 1969.
- 177 _____. Cell wall metabolism. Annu.Rev.Plant Physiol., 21:235-70, 1970.
- 178 LAMPORT, D.T.A. & MILLER, D.H. Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom. Plant Physiol., 48:454-6, 1971.
- 179 LAMPORT, D.T.A. The glycopeptide linkages of extensin: O-D-galactosyl serine and O-L-arabinosylhydroxyproline. In: LOEWS, F. Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. New York, Academic Press, 1973. p.149-65.
- 180 LA ROYA DEL CAFETO. Boletim Divulgativo, 68:1-8, 1980. San José. Reportagem.
- 181 LAVOURA: IBC mostra os números da safra. Rev. do Comércio de Café, 64(693):17-9, 1984. Reportagem.
- 182 LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. In: GINSBURG, V. Complex carbohydrates - Part B. New York, Academic Press, 1972. p.178-95.
- 183 LOOMIS, W.D. & BATAILLE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry, 5(2):423-38, 1966.
- 184 LOVREKOVICH, L.; LOVREKOVICH, H. & STAHMANN, M.A. Inhibition of phenol oxidation by E. carotovora in potato tuber tissue and its significance in disease resistance. Phytopathology, 57:737-42, 1967.

- 185 LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem., 193:265-75, 1951
- 186 MACKO, V.; STAPLES, R.C.; GERSHON, H. & RENWICK, J.A.A. Self-inhibitor of bean rust uredospores: methyl-3,4-dimethoxycinnamate. Science, 170(3957):539-40, 1970.
- 187 MACKO, V.; STAPLES, R.C.; ALLEN, P.J. & RENWICK, J.A.A. Identification of the germination self-inhibitor from wheat stem rust uredospores. Science, 173(3999):835-6, 1971.
- 188 MACLEAN, D.J.; SARGENT, J.A.; TOMMERUP, I.C. & INGRAM, D.S. Hypersensitivity as the primary event in resistance to fungal parasites. Nature, 249(5453):186-7, 1974.
- 189 MAEKAWA, E. & KITAO, K. Isolation and constitution of a xylan from Bamboo. Agr.Biol.Chem., 37(9):2073-81, 1973.
- 190 MAEKAWA, E. Isolation and fractionation of water-soluble polysaccharides from Bamboo shoot. Agr.Biol.Chem., 39(12):2281-9, 1975.
- 191 . The structure of water-soluble polysaccharides isolated from Bamboo shoot. Agr.Biol.Chem., 39(12):2291-6, 1975.
- 192 MANIÑGAT, C.C. & JULIANO, B.O. Composition of cell wall preparations of rice bran and germ. Phytochemistry, 21(10):2509-16, 1982.
- 193 MANKARIOS, A.T.; HALL, M.A.; JARVIS, M.C.; THREFAAL, D.R. & FRIEND, J. Cell wall polysaccharides from onions. Phytochemistry, 19(7):1731-3, 1980.
- 194 MAULE, A.J. & RIDE, J.P. Ammonia-lyase and O-methyl transferase activities related to lignification in wheat leaves infected with Botrytis. Phytochemistry, 15(8):1661-4, 1975.
- 195 MAXEMEIUC, V. & DIETRICH, S.M.C. Presence of cellulolytic and pectinolytic activities in spore extrats from H. vastatrix Berk. & Br. (coffee rust). An.Acad.Bras.Cienc., 45(2):315-9, 1973.
- 196 MCILROY, R.J. A xylan from giant star grass, C. plectostachyus. J.Chem.Soc., 1161:6067-9, 1963.
- 197 MCNAB, J.M.; NEVINS, D.J. & ALBERSHEIM, P. Differential resistance of cell walls of A. pseudoplatanus, T. vulgare, H. vulgare and Z. mays to polysaccharide-degrading enzymes. Phytopathology, 57:625-31, 1967.
- 198 MCNEIL, M.; ALBERSHEIM, P.; TAIZ, L. & JONES, R.L. The structure of plant cell walls. VII-Barley aleurone cells. Plant Physiol., 55:64-8, 1975.

- 199 MILLER, D.H.; LAMPORT, D.T.A. & MILLER, M. Hydroxyproline hetero-oligosaccharides in *Chlamidomonas*. Science, 176: 918-20, 1972.
- 200 MILLER, D.H.; MELLMAN, R.W. & LAMPORT, D.T.A. The chemical composition of the cell wall of *C. gymnogama* and the concept of a plant cell wall protein. J.Cell.Biol., 63:420-9, 1974.
- 201 MONRO, J.A.; BAILEY, R.W. & PENNY, D. Cell wall hydroxyproline-polysaccharide associations in *Lupinus hypocotyls*. Phytochemistry, 13(2):375-82, 1974.
- 202 _____. Differential alkali-extraction of hemicellulose and hydroxyproline from non-delignified cell walls of *Lupinus hypocotyls*. Carbohydr.Res., 41:153-61, 1975.
- 203 _____. The organization and growth of primary cell walls of *Lupinus hypocotyl*. Phytochemistry, 15(5):1193-8, 1976.
- 204 MONTGOMERY, R. Glycoproteins. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. The Carbohydrates-Chemistry and Biochemistry. 2a. ed., New York, Academic Press, 1970. v. 2B, p.667-9.
- 205 MORI, M.; EDA, S. & KATO, K. Two xyloglucan oligosaccharides obtained by cellulase-degradation of Tobacco arabinoxyloglucan. Agr.Biol.Chem., 43(1):145-9, 1979.
- 206 _____. Structural investigation of the arabinoxyloglucan from *N. tabacum*. Carbohydr.Res., 84:125-35, 1980.
- 207 MORISSON, I.M. Extraction of hemicelluloses from plant cell walls with water after preliminary treatment with methanolic sodium methoxide. Carbohydr.Res., 57:C₄-C₆, 1977.
- 208 MOUNT, M.S.; BATEMAN, F.D. & BASHAM, G.H. Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonase trans-eliminase. Phytopathology, 60:921-3, 1970.
- 209 MÜLLER, J.P. *Coffea arabica* L. In: MARTIUS, C.F.P. Flora Brasiliensis, Weinheim, Ed. Cramer, 1967. v.6, p.75-6.
- 210 MURAY, R.H.A. & NORTHCOTE, D.H. Oligoarabinosides of hydroxyproline isolated from potato lectin. Phytochemistry, 17(4):623-9, 1978.
- 211 MUSUMECI, M.R.; MORAES, W.B.C. & STAPLES, R.C. Evidência de um auto-inibidor da germinação nos uredosporos de *H. vastatrix*. Biológico, 39(7):171-3, 1973.
- 212 _____. A self-inhibitor in Uredospores of the Coffee rust fungus. Phytopathology, 64:71-3, 1974.
- 213 NACCACHE-MAXEMEIUC, V. & DIETRICH, S.M.C. Differences in leaf cell wall composition in cultivars of *C. arabica* resistant and susceptible to *H. vastatrix* (Coffee rust). Rev.Bras.Bot., 1:107-11, 1978.

- 214 NACCACHE-MAXEMEIUC, V. Alterações bioquímicas em folhas de C. arabica resistentes e susceptíveis à infecção por H. vastatrix (ferrugem do café). S.Paulo, 1983. 113. Tese. Doutorado. Escola Paulista de Medicina.
- 215 NAKAJIMA, T. & VOLCANI, B.E. 3,4-Dihydroxyproline: a new aminoacid in diatom cell walls. Science, 164:1400-1, 1969.
- 216 NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem., 153:375-80, 1944.
- 217 NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D. & ALBERSHEIM, P. Changes in the cell wall polysaccharides associated with growth. Plant Physiol., 43:914-22, 1968.
- 218 NEWBY, V.K.; SABLON, R.M.; SYNGE, R.L.M.; CASTEELE, K.V. & VAN SUMERE, C.F. Free and bound phenolic acids of Lucerne (Medicago sativa CV Europe). Phytochemistry, 19(4):651-7, 1980.
- 219 NEWTON, R. & ANDERSON, J.A. Studies on the nature of rust resistance in wheat. IV-Phenolic compounds of the wheat plant. Can.J.Res., 1:86-99, 1929.
- 220 NORTHCOTE, D.H. Chemistry of the plant cell wall. Annu.Rev. Plant Physiol., 23:113-32, 1972.
- 221 O'DWYER, M.H. The hemicelluloses. Part IV-The hemicelluloses of beech wood. Biochem.J., 20:656-64, 1926.
- 222 OHTANI, K. & MISAKI, A. Structure cell wall polysaccharide isolated from cotyledon of Tora-bean (Phaseolus vulgaris). Agr.Biol.Chem., 44(9):2029-38, 1980.
- 223 OLIVEIRA, M.L. Alguns aspectos estruturais de O-acetil-(4-O-metil-glucorono)xilano de M. bracaatinga. Curitiba, 1977. 41 p. Tese. Mestrado. U.F.PR.
- 224 OLSON, A.C. Proteins and plant cell wall. Proline to hydroxyproline in Tobacco suspension cultures. Plant Physiol., 39:543-50, 1964.
- 225 OS PERIGOS QUE AINDA AMEAÇAM O MERCADO. Rev. do Comércio de Café, 64(693):14-16, 1984. Reportagem.
- 226 O'NEILL, M.A. & SELVENDRAN, R.R. Glycoproteins from the cell wall of P. coccineus. Biochem.J., 187:53-63, 1980.
- 227 O'NEILL, M.A. & ROBERTS, K. Methylation analysis of cell wall glycoproteins and glycopeptides from C. reinhardii. Phytochemistry, 20(1):25-8, 1981.
- 228 PASCUAL, C.G. & JULIANO, B.O. Properties of cell wall preparations of milled rice. Phytochemistry, 22(1):151-9, 1983.
- 229 PAULSEN, B.S. & LUND, P.S. Water-soluble polysaccharides of O. ficus-indica CV "Burbank's spineless". Phytochemistry, 18(4):569-71, 1979.

- 230 PEGG, G.F. & VESSEY, J.C. Chitinase activity in Lycopersicon sculentum and its relationship to the in vivo lysis of Verticillium albo-atrum mycelium. Physiol.Plant Pathol., 3(2):207-22, 1973.
- 231 PEREIRA, E. Contribuição ao conhecimento da família Rubiaceae. Rodriguêsia, 28,29:55-7, 1954.
- 232 POPE, D.G. Relationships between hydroxyproline-containing proteins secreted into the cell wall and medium by suspension-cultured A. pseudoplatanus cells. Plant Physiol., 59:894-900, 1977.
- 233 PRESTON, R.D. Polysaccharide conformation and cell wall function. Annu.Rev.Plant Physiol., 30:55-78, 1979.
- 234 PRIDHAM, J.B. Phenolics in plants in health and disease. New York, Pergamon Press, 1960. p.9-99.
- 235 PUSZTAI, A. & WATT, W.B. Fractionation and characterization of glycoproteins containing hydroxyproline from the leaves of V. fava. Eur.J.Biochem., 10:523-32, 1969.
- 236 RAUVALA, H.; FINNE, J.; KRUSIUS, T.; KÄRKKÄINEN, J. & JÄRNEFELT, J. Methylation techniques in the structural analysis of glycoproteins and glycolipids. Adv.Carbohydr.Chem. and Biochem., 38:390-1, 1971.
- 237 RAY, P.M. Sugar composition of Oat-coleoptile cell walls. Biochem.J., 89:144-150, 1963.
- 238 REUNIÃO LATINO AMERICANA DE FITOTECNIA. A ferrugem do caféiro no Brasil. Bogotá, 1970. 75p.
- 239 RING, S.G. & SELVENDRAN, R.R. Purification and methylation analysis of cell wall material from S. tuberosum. Phytochemistry, 17(4):745-52, 1978.
- 240 _____. Isolation and analysis of cell wall material from beeswing wheat bran (T. aestivum). Phytochemistry, 19(7):1723-30, 1980.
- 241 _____. An arabinogalactoxyloglucan from cell wall of S. tuberosum. Phytochemistry, 20(10):2511-9, 1981.
- 242 RODRIGUES, C.J. Alguns aspectos sobre la roya anaranjada del caféto. México, 1978. 26p. Contribuição ao 8º Cong. Nacional de Fitopatologia.
- 243 RODRIGUES, C.J.; BETTENCOURT, A.J. & RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Annu.Rev.Phytopathology, 13:49-70, 1975.
- 244 ROMANKO, R.R. A physiological basis for resistance of Oats to Victoria blight. Phytopathology, 49:32-6, 1959.
- 245 ROLAND, J.C.; VIAN, B. & REIS, D. Observations with cytochemistry and ultracryotomy on the fine structure of the expanding walls in actively elongating plant cells. J.Cell.Sci., 19:239-59, 1975.

- 246 SABIR, M.A.; SOSULSKI, F.W. & FINLAYSON, A.J. Chlorogenic acid-Protein interactions in sunflower. Agr.Food.Chem., 22(4):575-8, 1974.
- 247 SACHS, I.B.; NAIR, V.M.G. & KUNTZ, J.E. Penetration and degradation of cell walls in Oaks infected with C. fagacearum. Phytopathology, 60:1399-404, 1970.
- 248 SADAVA, D. & CHRISPPEELS, M.J. Hydroxyproline biosynthesis in plant cells peptidyl proline hydroxylase from carrots disks. Biochem.Biophys.Acta, 227:278-87, 1971
- 249 SAFRÁ, Produção mundial cresceu 11 por cento. Rev. do Comércio de Café, 64(694):34-5, 1984.
- 250 SANDFORD, P.A. & CONRAD, H.E. The structure of the A. aerogenes A_{3(S1)} polysaccharide. I-A reexamination using improved procedures for methylation analysis. Biochem., 5:1508-17, 1966.
- 251 SAVILLE, D.B.O. Coevolution of the rust fungi and their hosts. The Quaterly Review of Biology, 46(3):211-8, 1971.
- 252 SAWARDEKER, J.S.; SLONECKER, J.H. & JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. Anal.Chem., 37:1602-4, 1965.
- 253 SCHEFFER, R.P. & PRINGLE, K.B. Uptake of H. victoriae toxin by oat tissue. Phytopathology, 54:832-5, 1964.
- 254 SCOTT, J.E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues. In: GLICK, D. Methods of Biochemical Analysis, New York, Interscience, 1960. v.8. p.145-97.
- 255 _____. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. In: WHISTLER, R.L. Methods in Carbohydrate Chemistry, New York, Academic Press, 1965. v.5, p.38-44.
- 256 SCOTT, K.J. Obligate parasitism by phytopathogenic fungi. Biol.Rev., 47:537-72, 1972.
- 257 SELVENDRAN, R.R.; DAVIES, A.M.C. & TIDDER, E. Cell wall glycoproteins and polysaccharides of mature runner beans. Phytochemistry, 14(11):2169-74, 1975.
- 258 SELVENDRAN, R.R. Cell wall glycoproteins and polysaccharides of parenchyma of P. coccineus. Phytochemistry, 14(11):2175-80, 1975.
- 259 SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F. & RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetal fiber. Anal. Biochem., 96:282-92, 1979.
- 260 SEMPIO, C. Metabolic resistance to plant diseases. Phytopathology, 40:799-819, 1950.

- 261 SHARON, N. Complex carbohydrates. Their chemistry and functions. London, Addison-Wesley Publ.Co., 1975. 466p.
- 262 SHIBUYA, N. & IWASAKI, T. Polysaccharides and glycoproteins in the rice endosperm cell wall. Agr.Biol.Chem., 42(12): 2259-66, 1978.
- 263 SHIBUYA, N. & MISAKI, A. Structure of hemicellulose isolated from rice endosperm cell wall: mode of linkages and sequences in xyloglucan, B-glucan and arabinoxylan. Agr. Biol.Chem., 42(12):2267-74, 1978.
- 264 SHIGERU, E. & KUNIO, K. An arabinoxyloglucan isolated from thre midrib of the leaves of N. tabacum. Agr.Biol.Chem., 42(2):351-7, 1978.
- 265 SIDDIQUI, I.R. & WOOD, P.J. Structural investigation of water-soluble, rape-seed (B. campestris) polysaccharides. Part I-Rape-seed amyloid. Carbohydr.Res., 17:97-108, 1971.
- 266 _____ Structural investigation of sodium hydroxide-soluble rape-seed (B. campestris) polysaccharides. Part V-Fucoamyloid. Carbohydr.Res., 53:85-94, 1977.
- 267 SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J.Biol.Chem., 160:61-8, 1945.
- 268 SMITH, L.B. & DOWNS, R.J. Resumo preliminar das Rubiáceas de Santa Catarina. Sellowia, 7:13-21, 1956.
- 269 SMITH, H. Recognition and defence in plants. Nature, 273: 266-8, 1978.
- 270 SPIRO, R.G. Analysis of glycoproteins. In: WHISTLER, R.L. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1976. v.7, p.185-467.
- 271 SRIVASTAVA, H.C. & SINGH, P.P. Structure of the polysaccharide from Tamarind kernel. Carbohydr.Res., 4:326-42, 1967.
- 272 STAHMANN, M.A.; MUSUMECI, M.R. & MORAES, W.B.C. Germination of coffee rust uredospores and their inhibition by cynamic acid derivatives. Phytopathology, 66:765-9, 1976.
- 273 STANEK, J.; CERNY, M.; KOCOUREK, J. & PACAK, J. The monosaccharides. New York, Academic Press, 1963. p.19-933.
- 274 STAUB, A.M. Removal of proteins. Sevag method. In: WHISTLER R.L. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1965. v.5, p.5-6.
- 275 STEPHEN, A.M.; KAPLAN, M.; TAYLOR, G.L. & LEISENGANG, E.C. Application of gas-liquid chromatography to the structural investigation of polysaccharides. Tetrahedron Suppl. 7:233-40, 1966.

- 276 STEPHEN, A.M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. The polysaccharides. New York, Academic Press, 1983. v.2, p.105-12.
- 277 STEVENS, B.J.H. & SELVENDRAN, R.R. Hemicellulosic polymere of cabbage leaves. Phytochemistry, 23(2):339-47, 1984.
- 278 STRAHM, A.; AMADO, R. & NEUKOM, H. Hydroxyproline-galactoside as a protein-polysaccharide linkãge in a water soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. Phytochemistry, 20(5):1061-3, 1981.
- 279 STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H. & SCHIMPER, A.F.W. Tratado de Botânica. 6a. ed., Barcelona, Ed. Marin, 1974. p.697-8.
- 280 STUART, D.A. & VARNER, J.E. Purification and characterization of a salt-extractable hydroxyproline-rich glycoprotein from aerated carrot discs. Plant Physiol., 66:787-92, 1980.
- 281 STUMPF, P.K. & CONN, E.E. The Biochemistry of Plant. New York, Academic Press, 1980. v.3. p.493-536.
- 282 TALMADGE, K.W.; KEEGSTRA, K.; BAUER, W.D. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. I-The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. Plant Physiol., 51:158-73, 1973.
- 283 TATAREAU, J.C. & AURIOL, P. Corr elation entre la virulence de C. lagenarium et son aptitude   d egrader les polyosides des parois cellulaires d'un h te sensible. C.R.Acad. Paris, 272:1304-6, 1972.
- 284 THOMAZIELLO, R.A. Ferrugem, a mais grave doença do cultivo. A Granja:62-3, maro 1979.
- 285 THOMPSON, E.W. & PRESTON, R.D. Protein in the cell walls of some green algae. Nature, 213:684-5, 1967.
- 286 TIMELL, T.E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Science and Technol., 1:45-70, 1967.
- 287 TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents. Nature, 166:444-5, 1950.
- 288 TOPPAN, A.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. & TOUS , A. An improved approach for the accurate determination of fungal pathogens in diseased plants. Physiol.Plant Pathol., 9:241-51, 1976.
- 289 TOPPAN, A.; ROBY, D. & ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Cell surfaces in plant-microorganism interactions. III-In vivo effect of ethylene on hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in the cell wall of diseased plants. Plant Physiol., 70:82-6, 1982.

- 290 UCHIYAMA, T.; SATO, J. & OGASAWARA, N. Lignification and qualitative changes of phenolic compounds in rice callus tissues inoculated with plant pathogenic fungi. Agr.Biol. Chem., 47(1):1-10, 1983.
- 291 VAN ETTEN, H.D.; MAXWALL, D.P. & BATEMAN, D.F. Lesion maturation, fungal development and distribution of endopolygalacturonase and cellulase in *Rhizoctonia*-infected bean hypocotyl tissues. Phytopathology, 57:121-6, 1967.
- 292 VAN SUMERE, C.F.; VAN SUMERE, P.C.; VIÑING, L.C. & LEDINGHAM, G.A. Coumarins and phenolic acids in the uredospores of wheat stem rust. Can.J.Microbiol., 3:847-62, 1957.
- 293 VALENT, B.S. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. V-On the binding of xyloglucan to cellulose fibers. Plant Physiol., 54:105-8, 1974.
- 294 WADA, S. & RAY, P.M. Matrix polysaccharides of Oat coleoptile cell walls. Phytochemistry, 17(5):923-31, 1978.
- 295 WATANABE, T.; TAKAHASHI, K. & MATSUDA, K. Isolation and characterization of oligosaccharides from purified cellulase digest jojoba (*S. chinensis*) seed xyloglucan. Agr.Biol. Chem., 44(4):791-7, 1980.
- 296 WEISS, L.C. Report on chlorogenic acid in coffee. Ass.Offic. Chem., 40(2):350-4, 1957.
- 297 WENZEL, G.E. & CORRÊA, J.B.C. Hemicelluloses from the leaves of coffee tree. I-Fractionation of the hemicellulose A and structural analysis of 4-O-methylglucuronoxylan. An. Acad.Bras.Ciênc., 49(4):605-13, 1977.
- 298 WENZEL, G.E. Fracionamento e purificação das hemiceluloses de folhas de cafeeiro (*C. arabica* L. var. Mundo Novo) - Análise estrutural de um 0-metilglucuronoxilano. Curitiba, 1975, 96p. Tese. Mestrado. U.F.PR.
- 299 WHISTLER, R.L. & FEATHER, M.S. Hemicellulose. Extraction from annual plants with alkaline solutions. In: WHISTLER, R.L. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1965. v.5, p.144-5.
- 300 WHISTLER, R.L. & RICHARDS, E.L. Hemicelluloses. In: PIGMAN, W. & HORTON, K. The Carbohydrates-chemistry and biochemistry. New York, Academic Press, 1970. v.2A, p.447-69.
- 301 WHITE, E.V. & RAO, P.S. Constitution of the polysaccharide from Tamarind seed. J.Am.Chem.Soc., 75:2617-9, 1953.
- 302 WHITMORE, F.W. Phenolic acids in wheat coleoptile cell walls. Plant Physiol., 53:728-31, 1974.
- 303 _____. Lignin-protein complex in cell walls of *P. Elliottii*: aminoacid constituents. Phytochemistry, 21(2):315-8,

- 304 WILDER, B.M. & ALBERSHEIM, P. The structural of plant cell walls. IV-A structural comparison of the cell wall hemicellulose of cell suspension-cultured of sycamore and of red kidney bean. Plant Physiol., 51:889-93, 1973.
- 305 WILKIE, K.C.B. & WOO, S-L. Non-cellulosic B-D-Glucans from bamboo, and interpretative problems in the study of all hemicelluloses. Carbohydr.Res., 49:399-409, 1976.
- 306 _____. A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. Carbohydr.Res., 57:145-62, 1977.
- 307 WILKIE, K.C.B. The hemicelluloses of grasses and cereals. Adv.Carbohydr.Chem. and Biochem., 36:215-64, 1979.
- 308 WINSTEAD, N.N. & WALKER, J.C. Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. Phytopathology, 44:153-8, 1974.
- 309 WOLD, J.K. & HILLESTAD, A. The demonstration of galactosamine in a higher plant: C. sativa. Phytochemistry, 15(2):325-6, 1976.
- 310 WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R.L. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1963. v.2, p.211-5.
- 311 WOOD, R.K.S. Introduction: disease resistance in plants. Proc.R.Soc.Lond.B, 181:213-32, 1972.
- 312 WOOLARD, G.R. & RATHBONE, E.B. Structural studies on a glucuronarabinoxylan from the husk of sorghum grain. Carbohydr.Res., 51:239-47, 1976.
- 313 _____. Structural studies on three hemicellulose B fractions from the husk of sorghum grain. Carbohydr.Res., 59:547-52, 1977.
- 314 YAMAGISHI, T.; MATSUDA, K. & WATANABE, T. Isolation and partial characterization of proteoglycans from rice-bran. Carbohydr.Res., 43:321-33, 1975.
- 315 _____. Characterization of the fragments obtained by enzymic and alkaline degradation of rice-bran proteoglycans. Carbohydr.Res., 50:64-74, 1976.
- 316 ZULUAGA, J.V.; VALENCIA, A.G. & GONZALEZ, J. Contribucion al estudio de la naturaleza de la resistencia del cafeto a C. fimbriata. Cenicafé, 22:43-68, 1971.
- 317 _____. Contribucion al estudio de la naturaleza de la resistencia del cafeto a C. fimbriata. II. Cenicafé, 22:109-25, 1971.

Trabalhos publicados

- 1 - Hemicelluloses from leaves of the Coffee tree. Part II - Structural studies of hemicelluloses B from cultivars of Coffea arabica L. var. Mundo Novo, susceptible and resistant to coffee rust (Hemileia vastatrix). An. Acad. Bras. Ciênc., 55(4):331-8, 1983.
- 2 - Hemicellulosic polymers from the leaves of Coffea arabica. Phytochemistry, 23(6):1271-6, 1984.

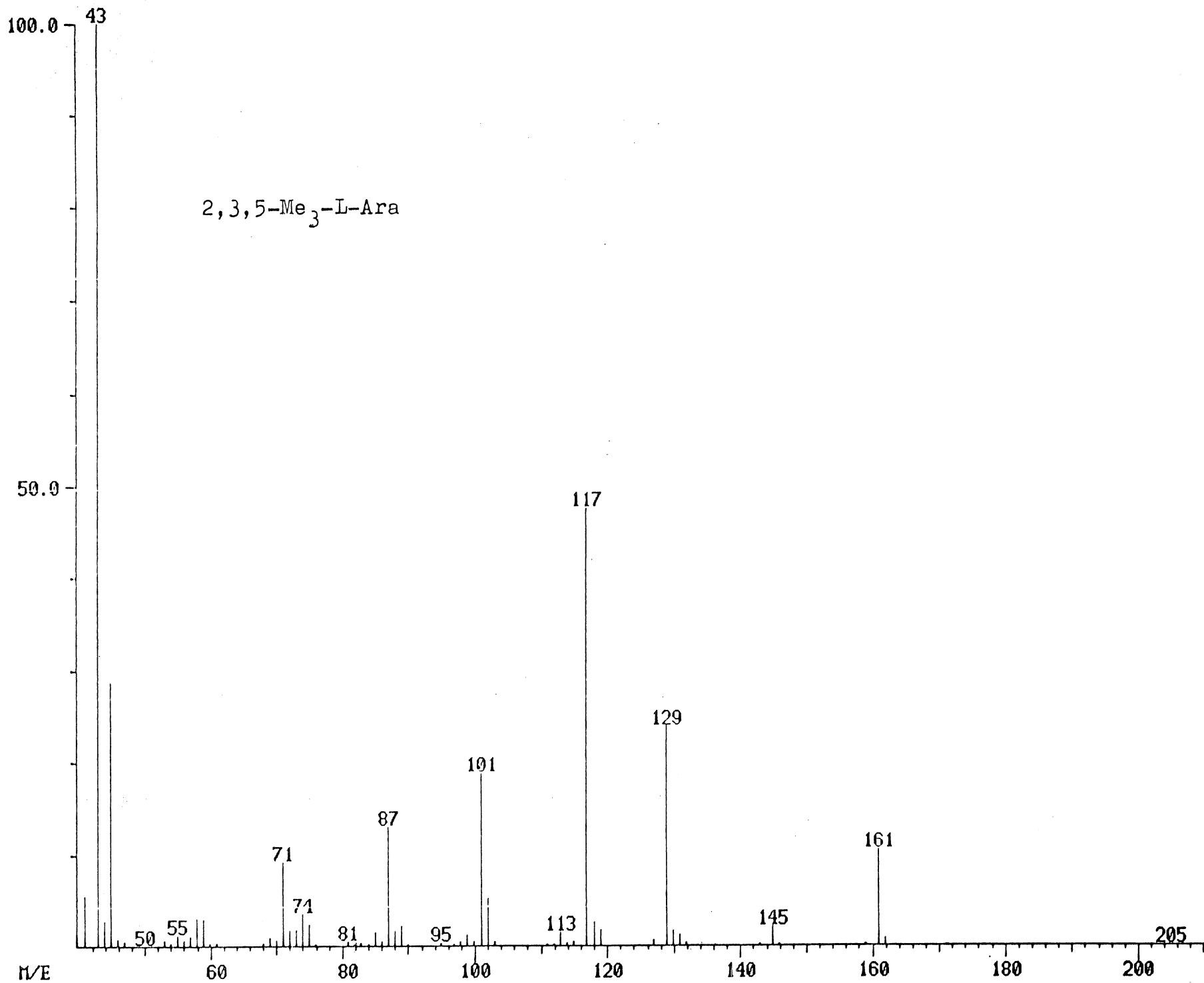
Trabalhos apresentados nos Simpósios de Bioquímica (Caxambú - MG).

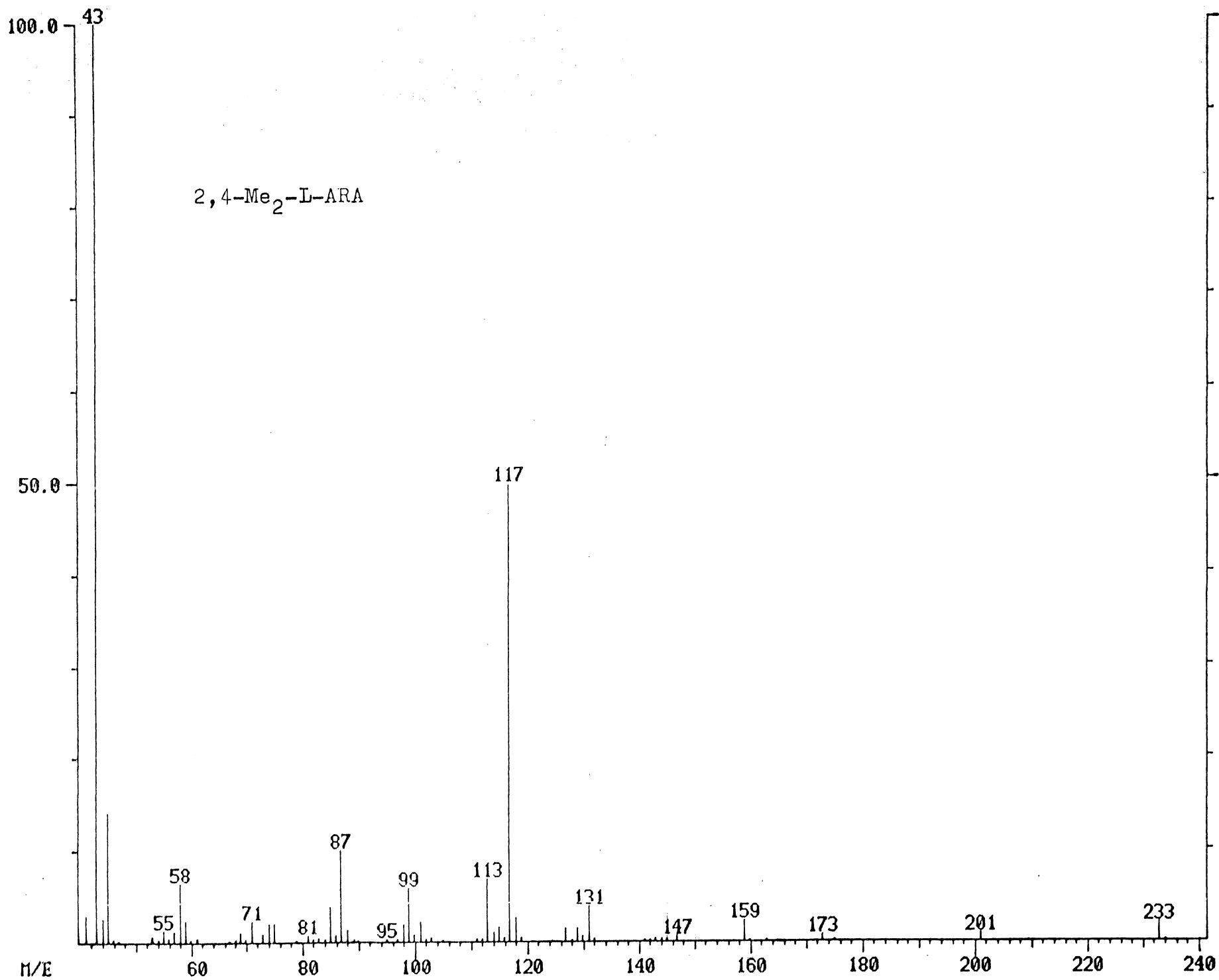
- 1980 - Estudo de hemicelulose B em folhas de Coffea arabica L. var. Mundo Novo (susceptível). Arq. Biol. Tecnol. 23(2):157, 1980
- 1981 - Estudo de hemicelulose B em folhas de Coffea arabica L. var. Mundo Novo (SH₄) resistente à ferrugem. Arq. Biol. Tecnol. 24(1):168, 1981.
- 1982 - Peptidoglicanas em hemicelulose B de folhas de Coffea arabica L. var. Mundo Novo. Arq. Biol. Tecnol. 25(1):63, 1982.
- 1983 - Ação enzimática (Hemileia vastatrix) sobre hemiceluloses totais de folhas de Coffea arabica L. var. Mundo Novo. Arq. Biol. Tecnol. 26(2):325, 1983.

6 - APÊNDICE

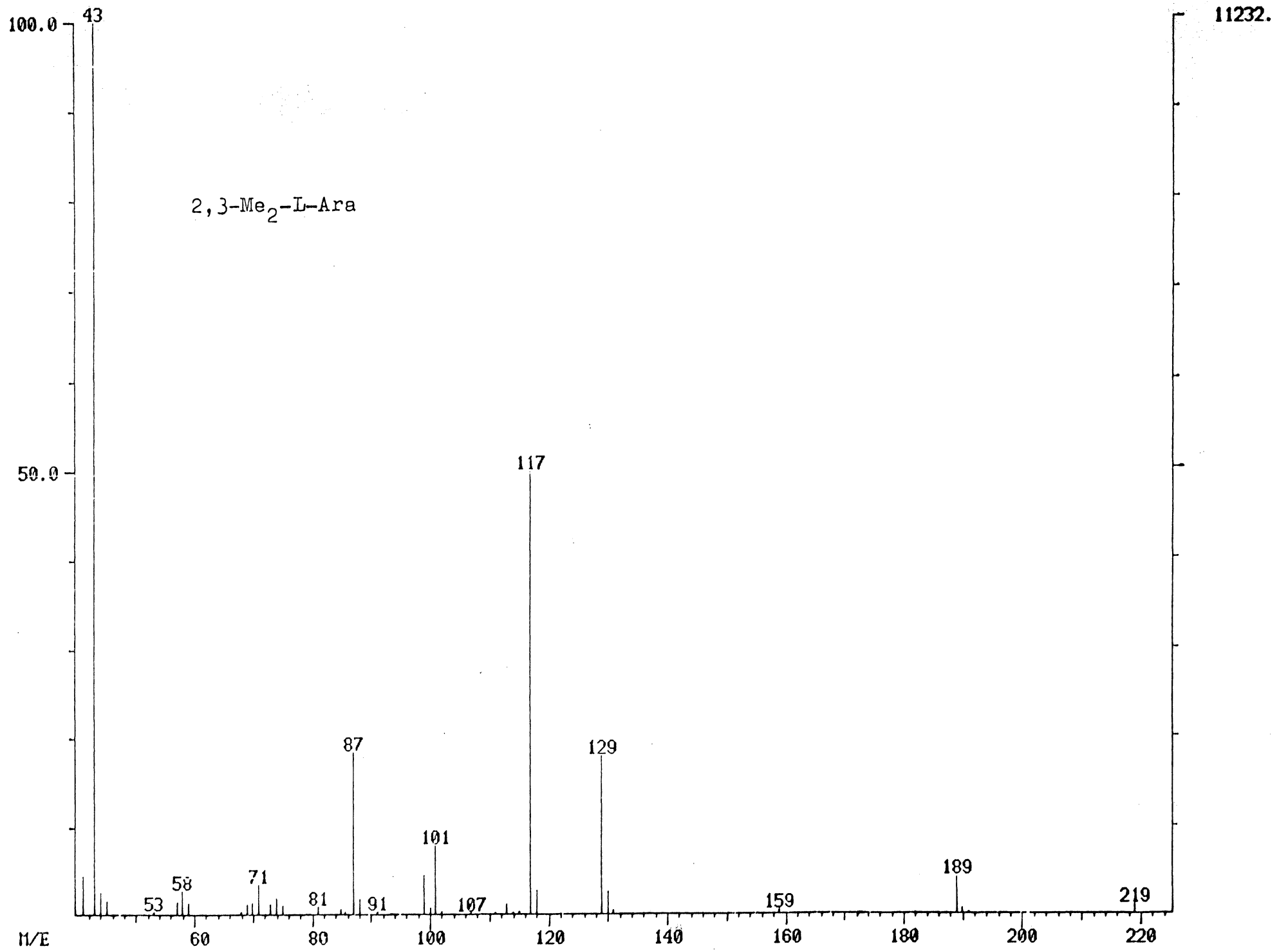
Fragmentação de massa dos derivados metilados
de políssacarídeos.....158-172

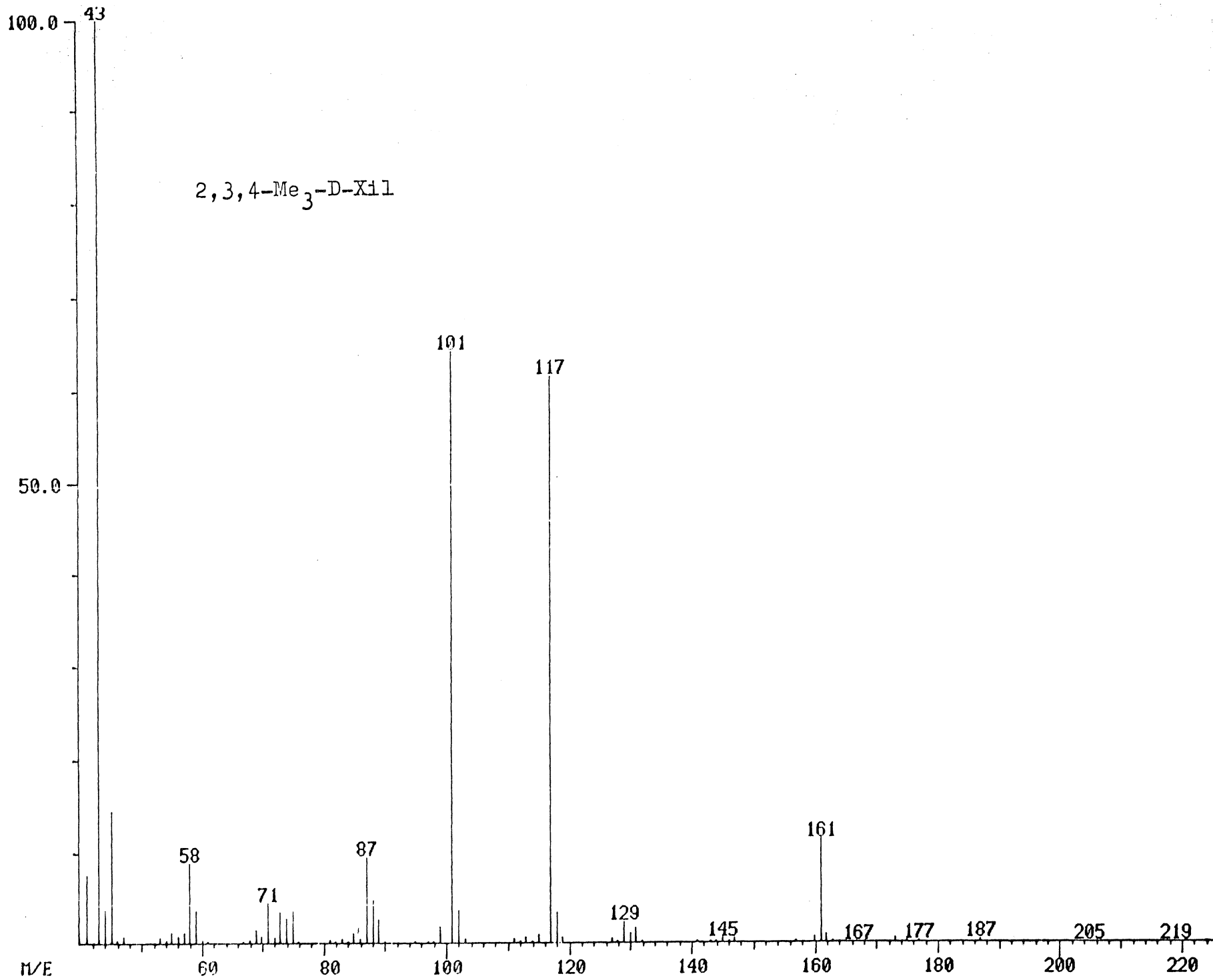
Fragmentação de massa dos derivados metilados
do composto fenólico.....173-182



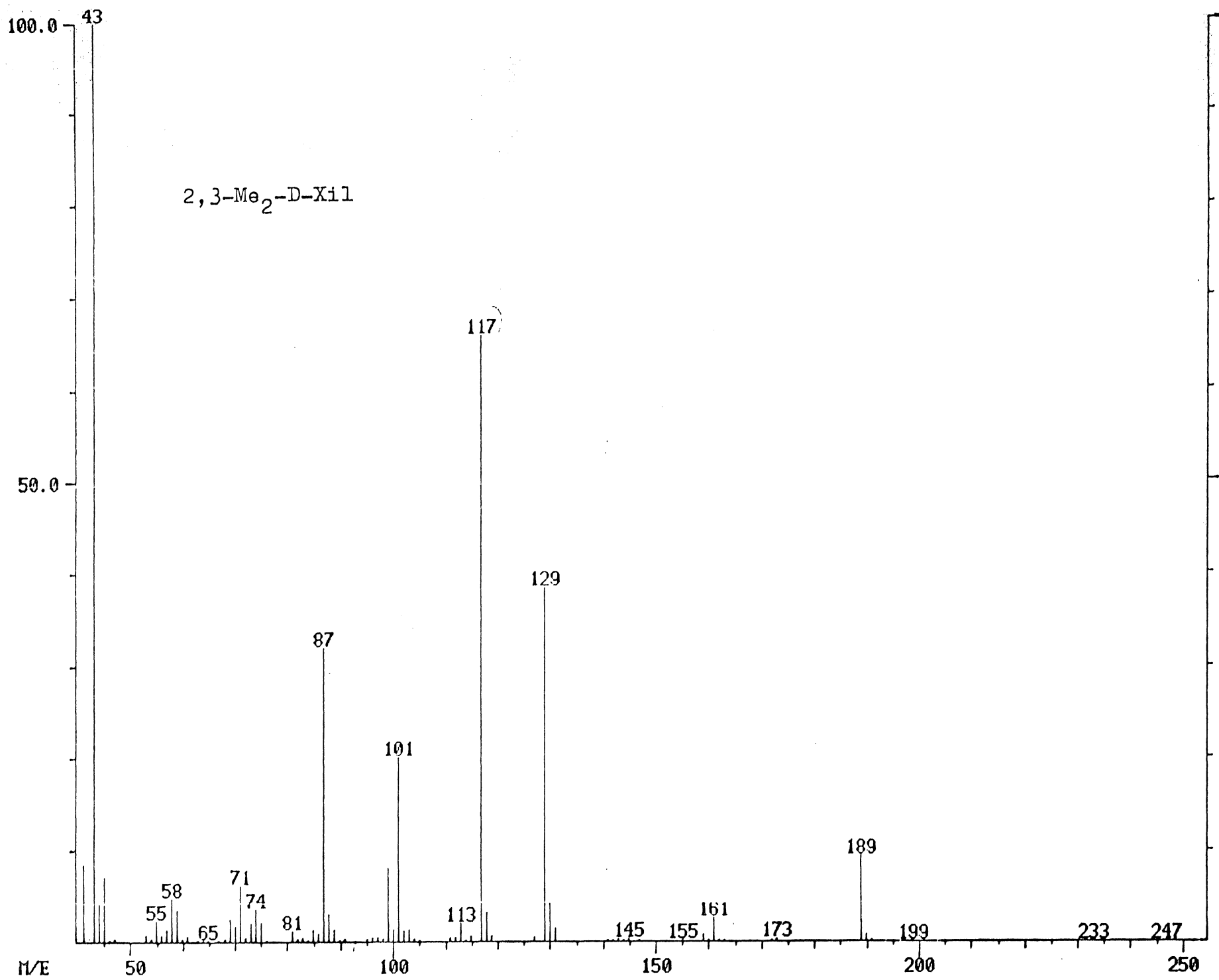


48576.

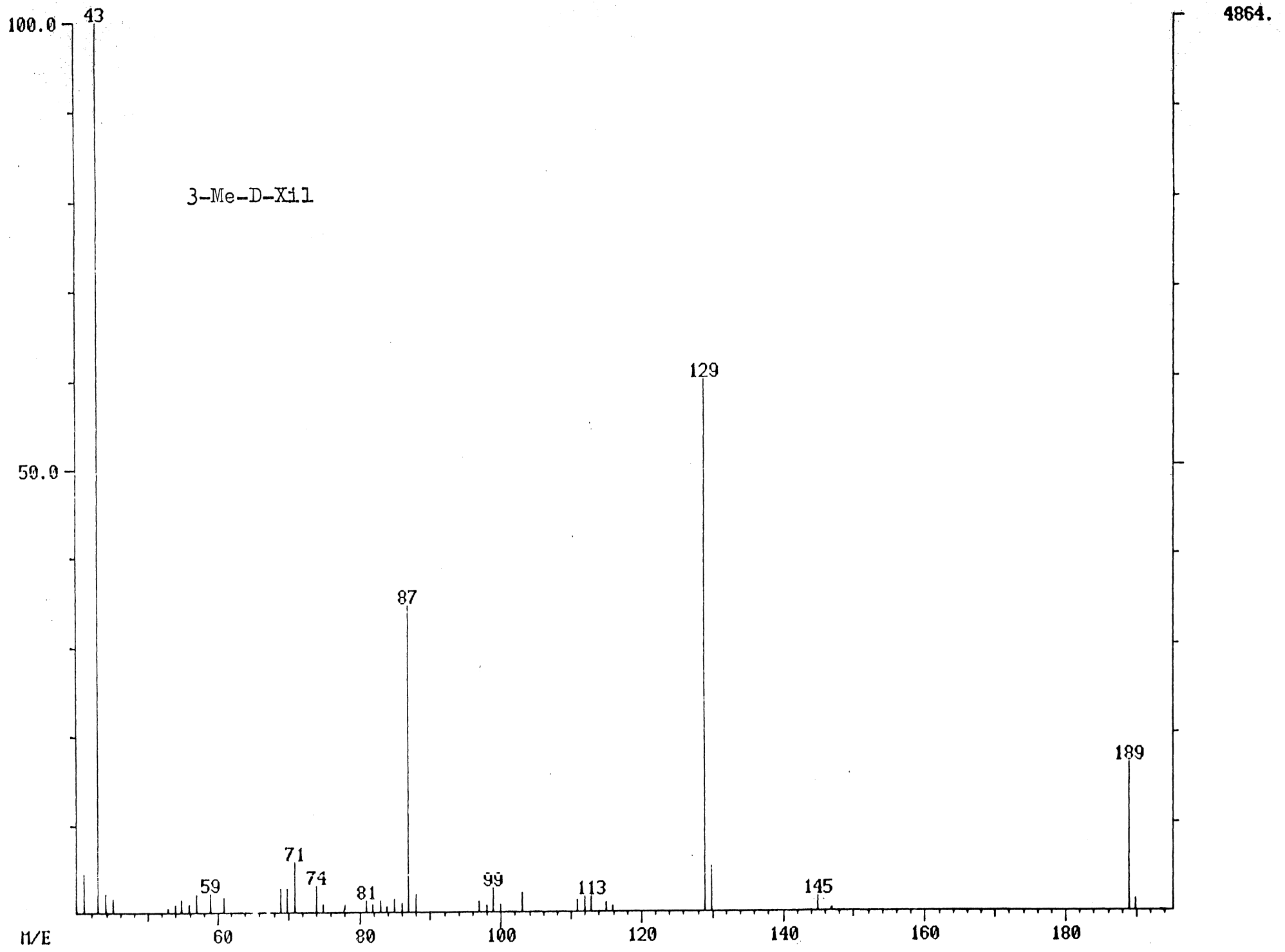


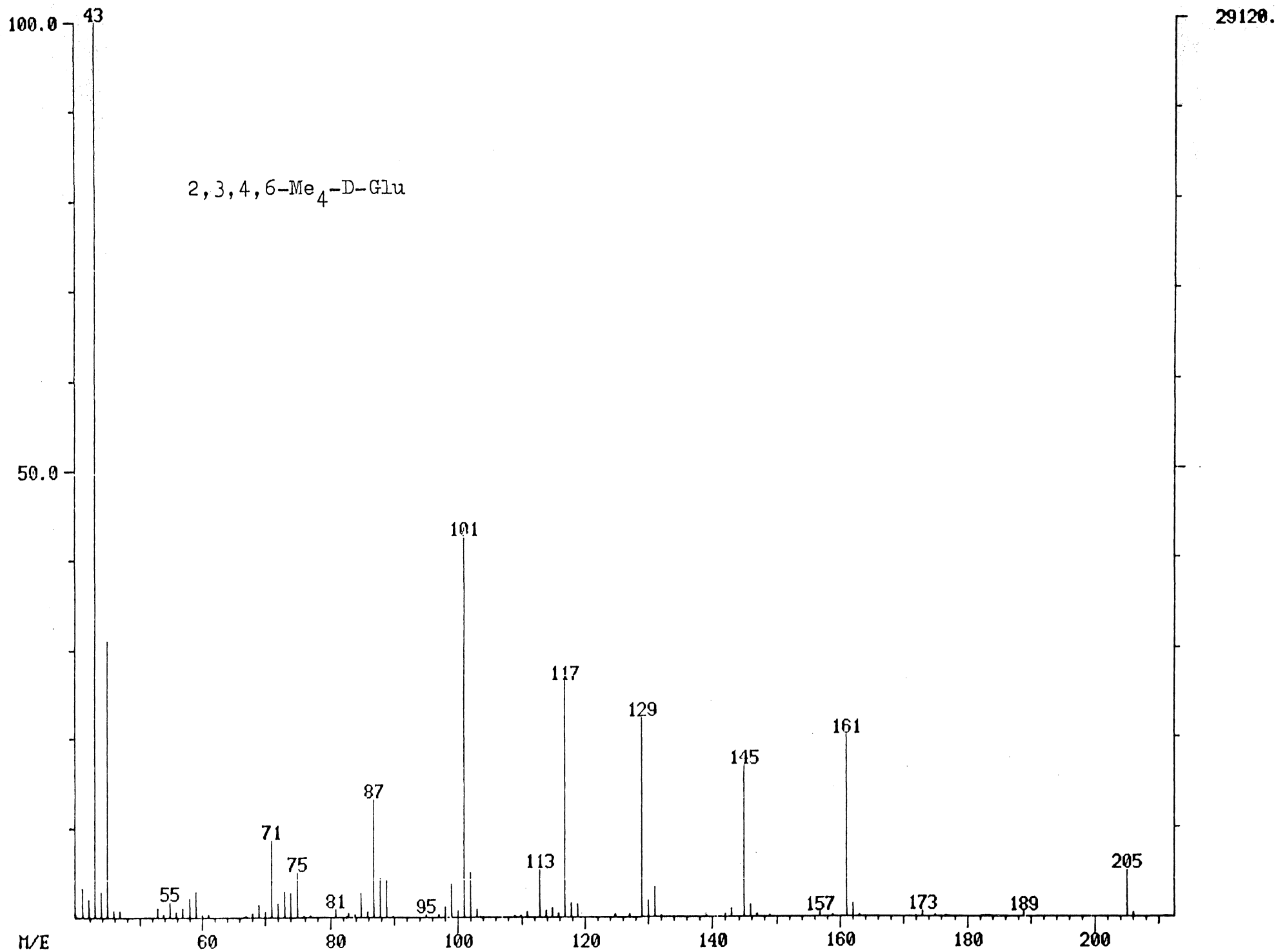


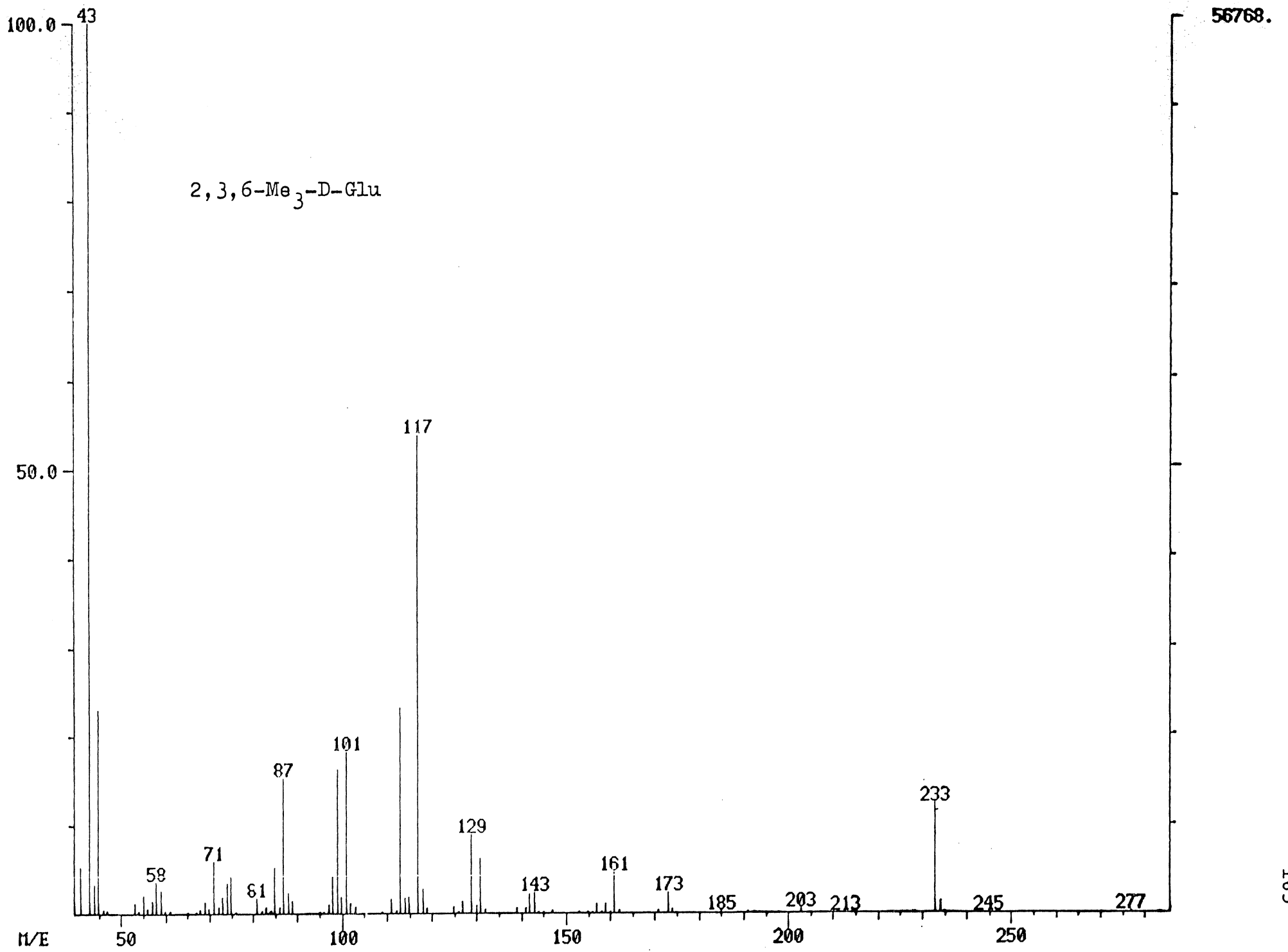
126976.

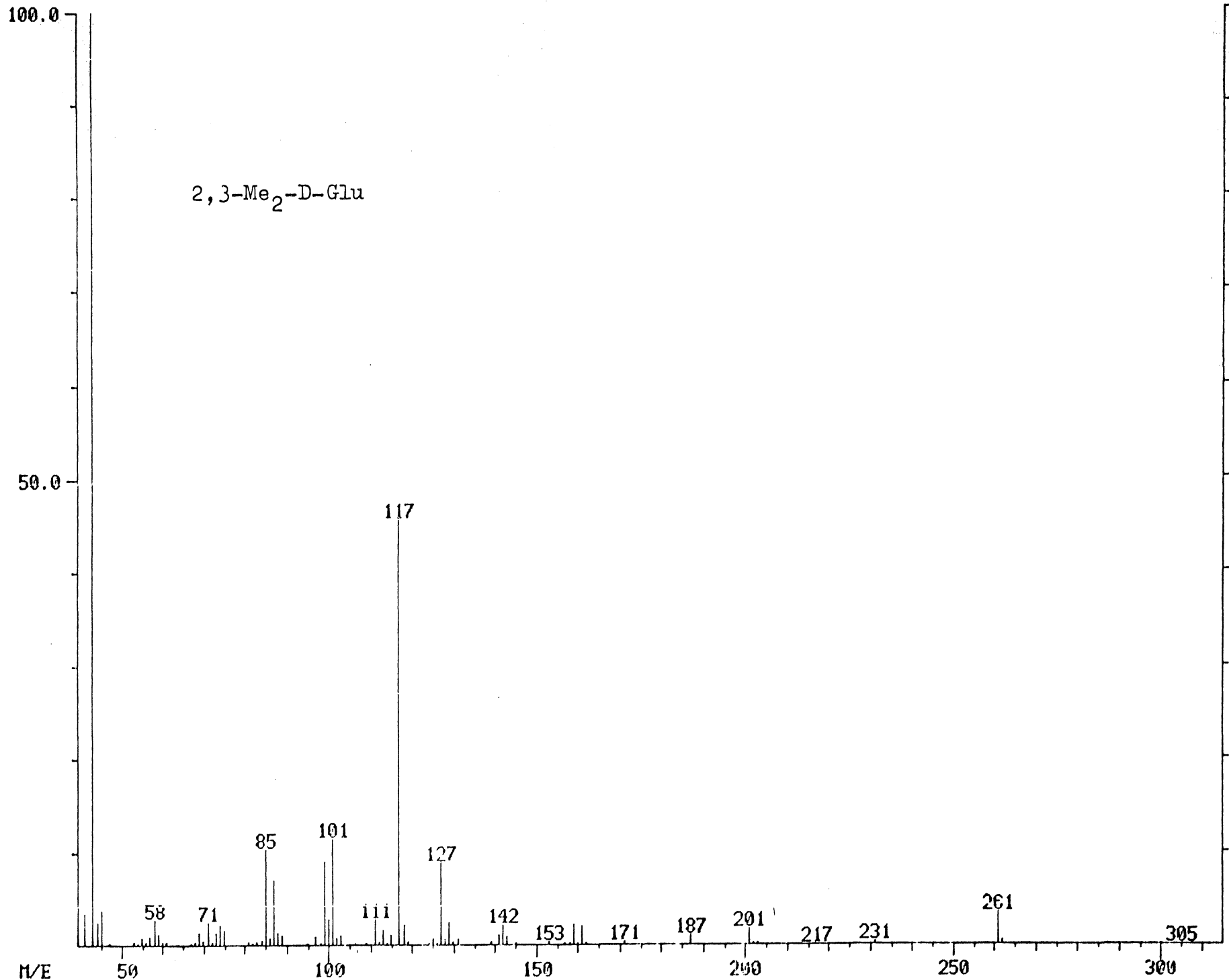


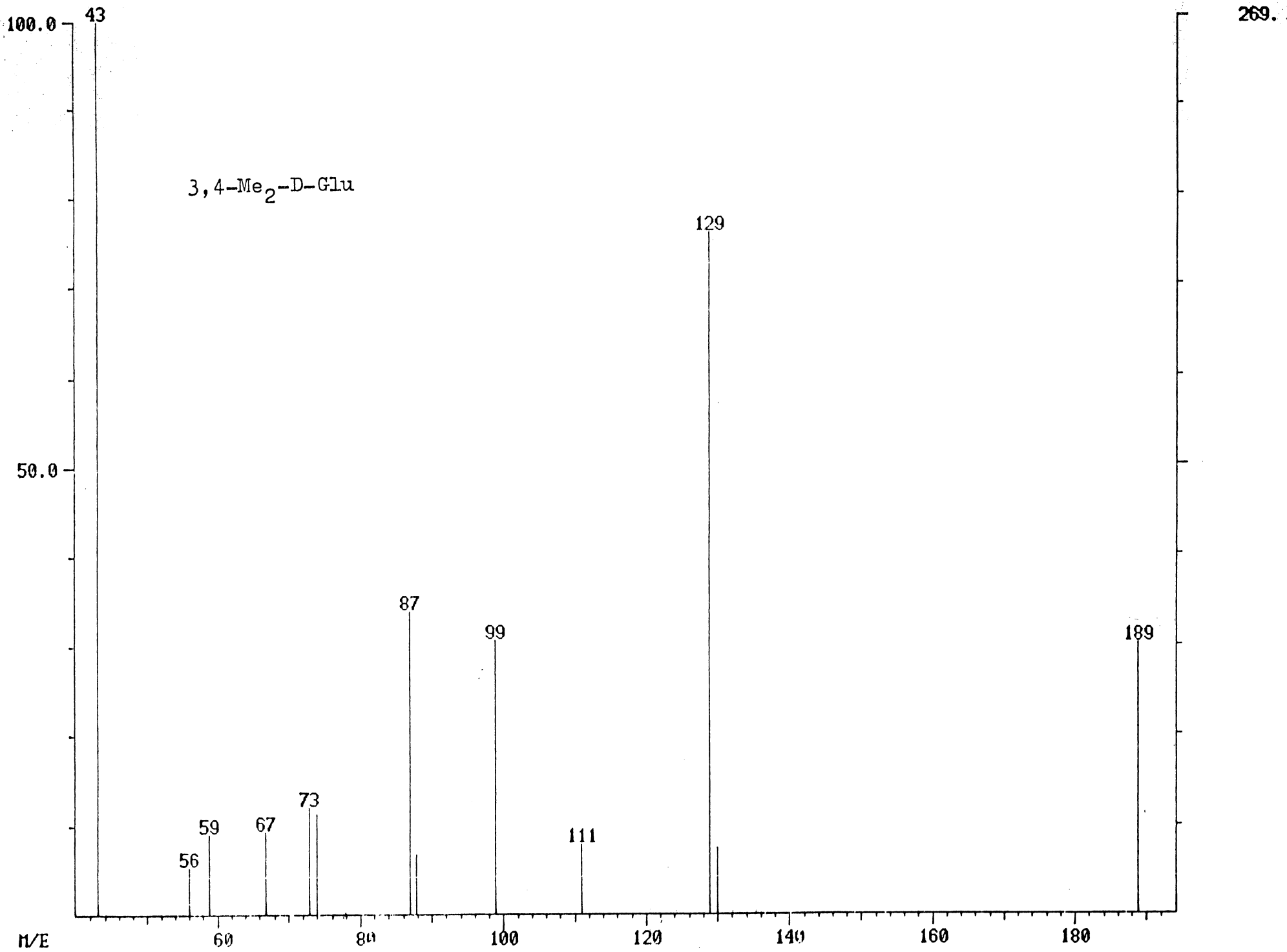
73856.

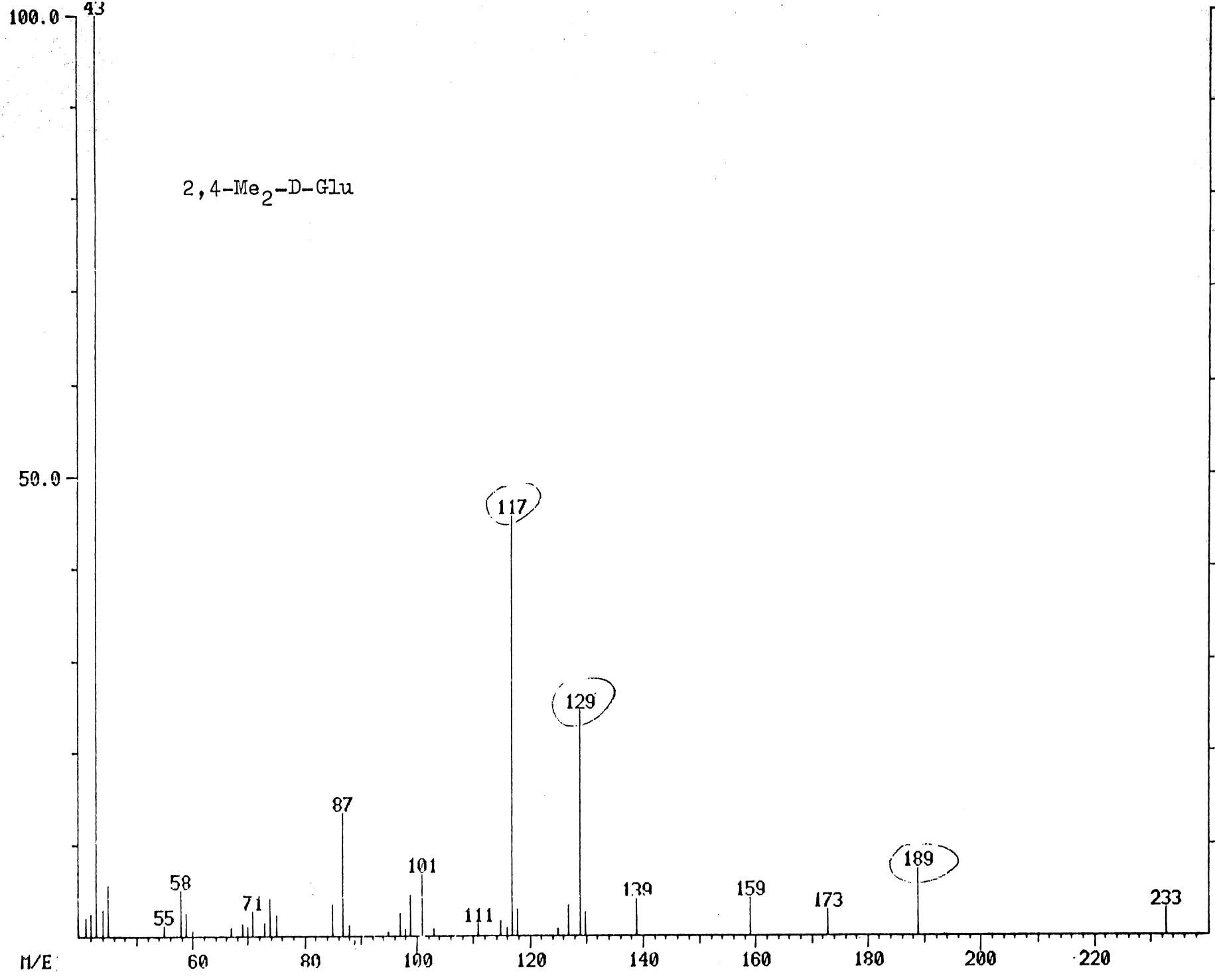












100.0

43

2,6-Me₂-D-Glu

50.0

117

129

87

101

58

71

139

143

159

173

189

233

M/E

60

80

100

120

140

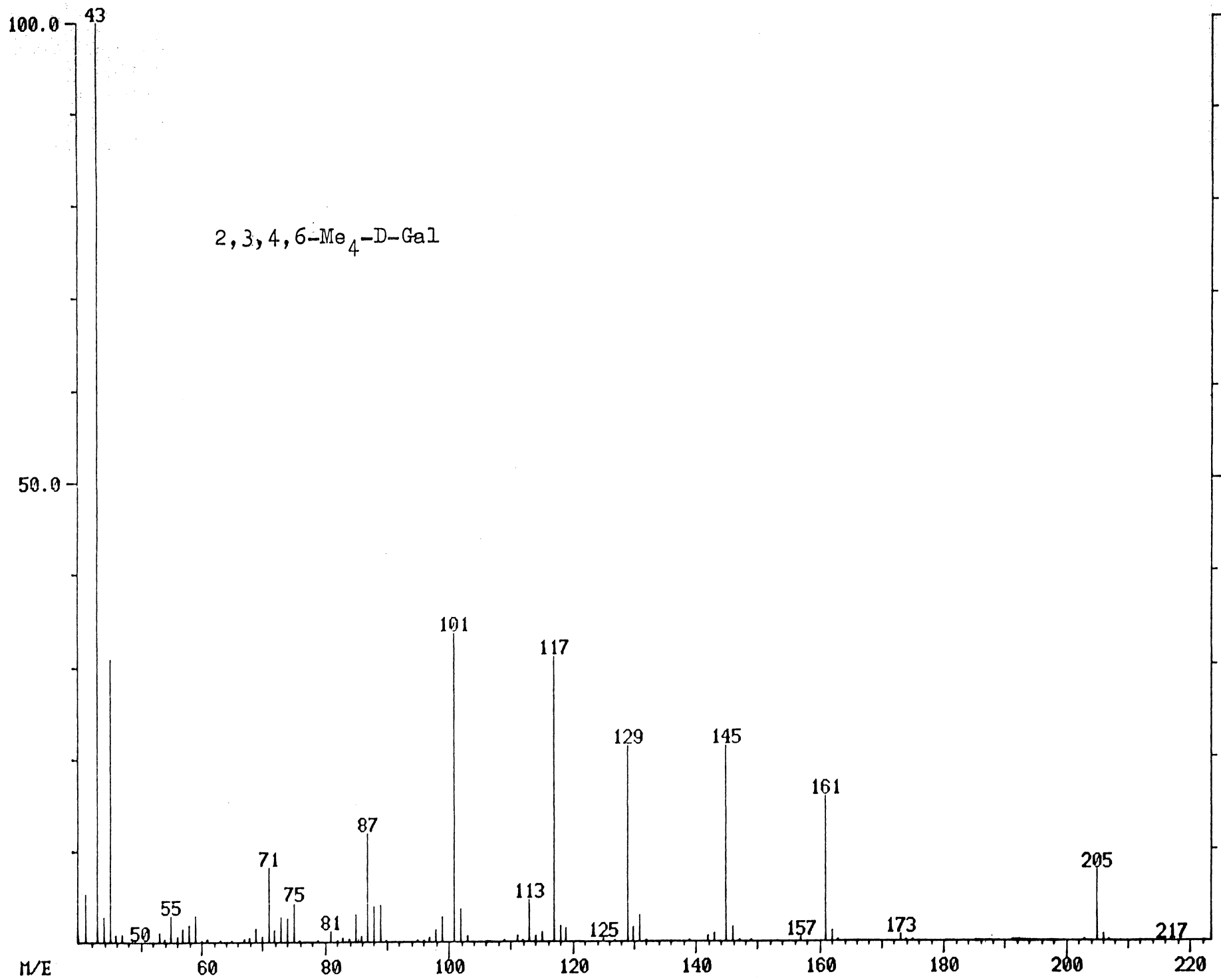
160

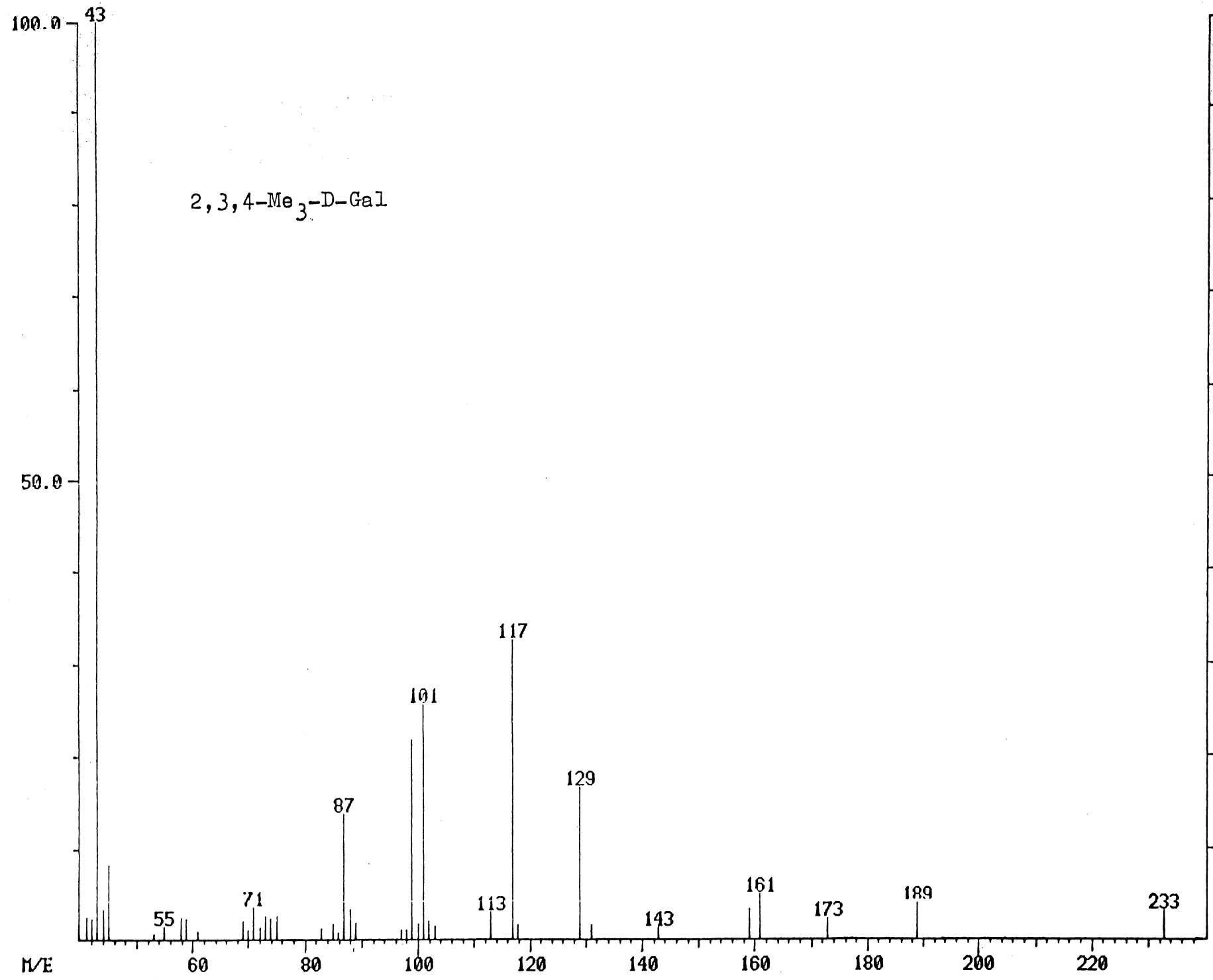
180

200

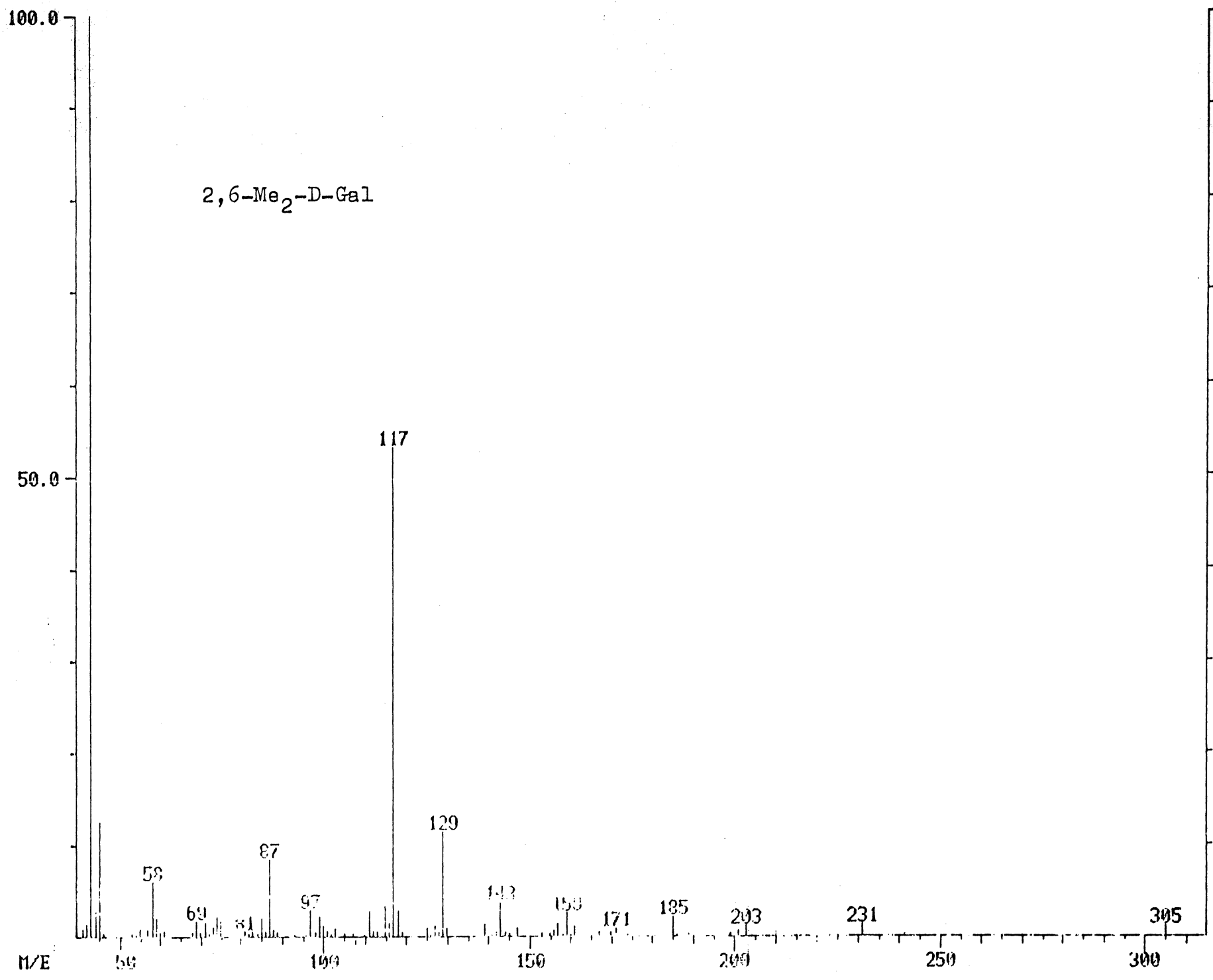
220

1176.

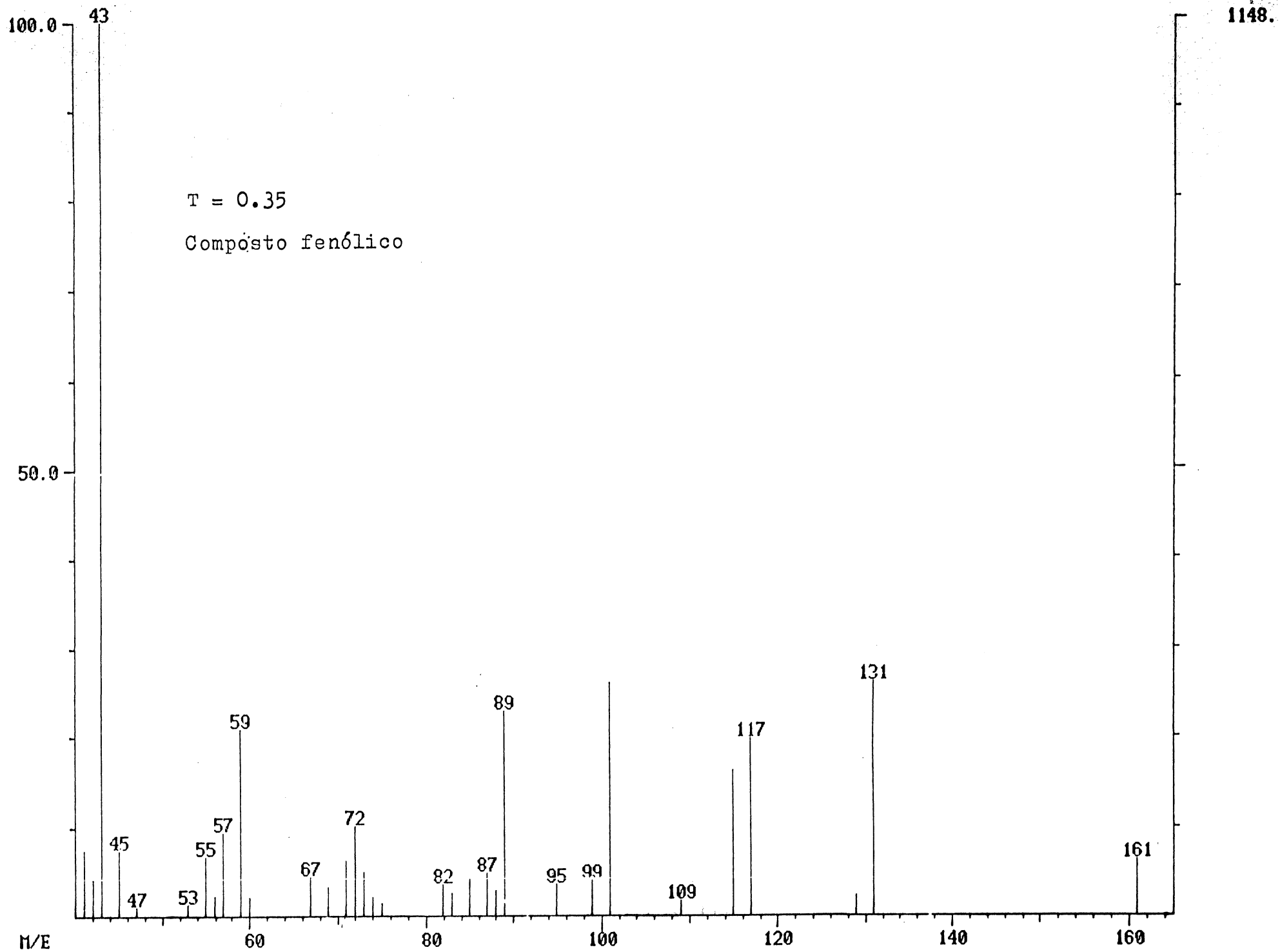


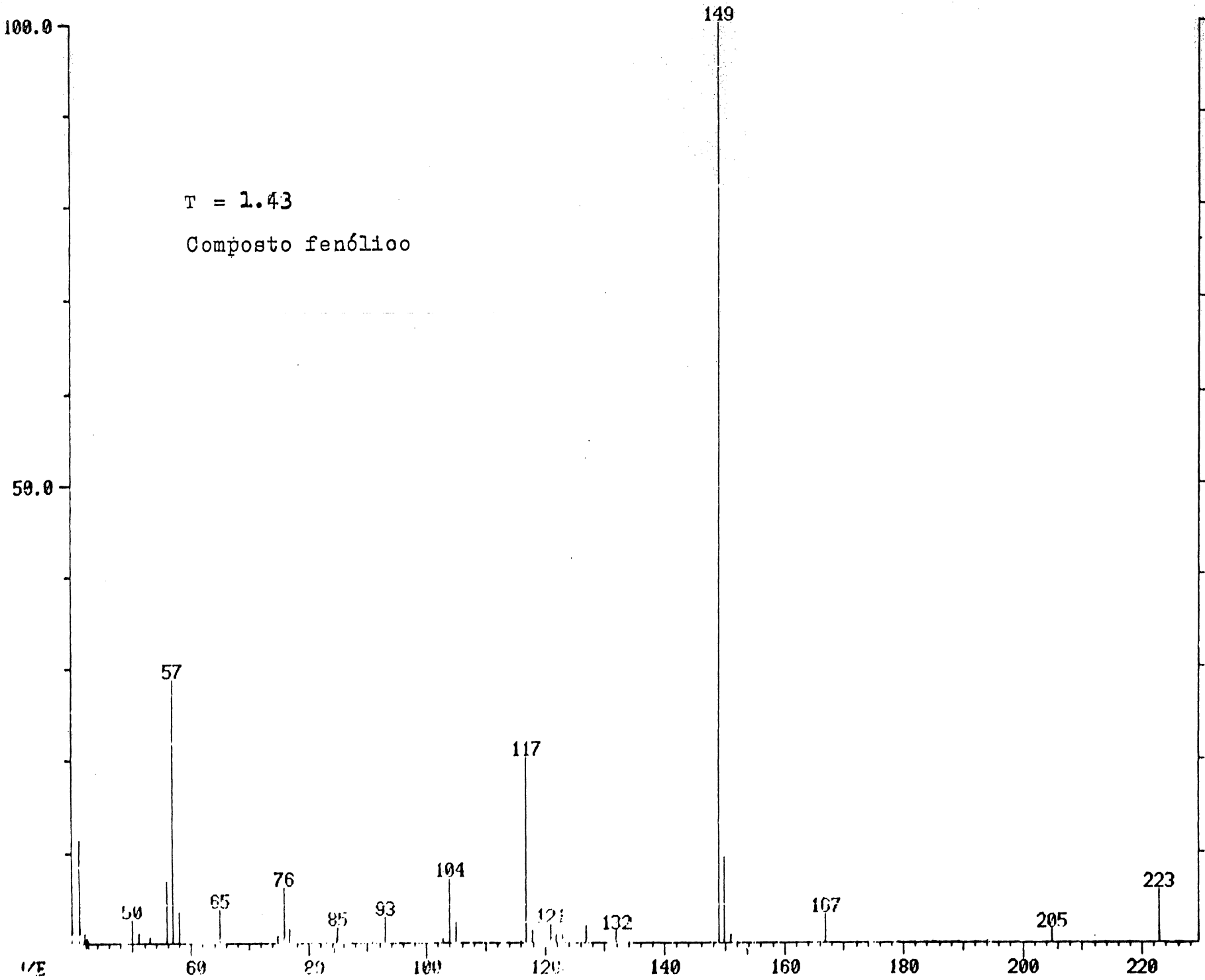


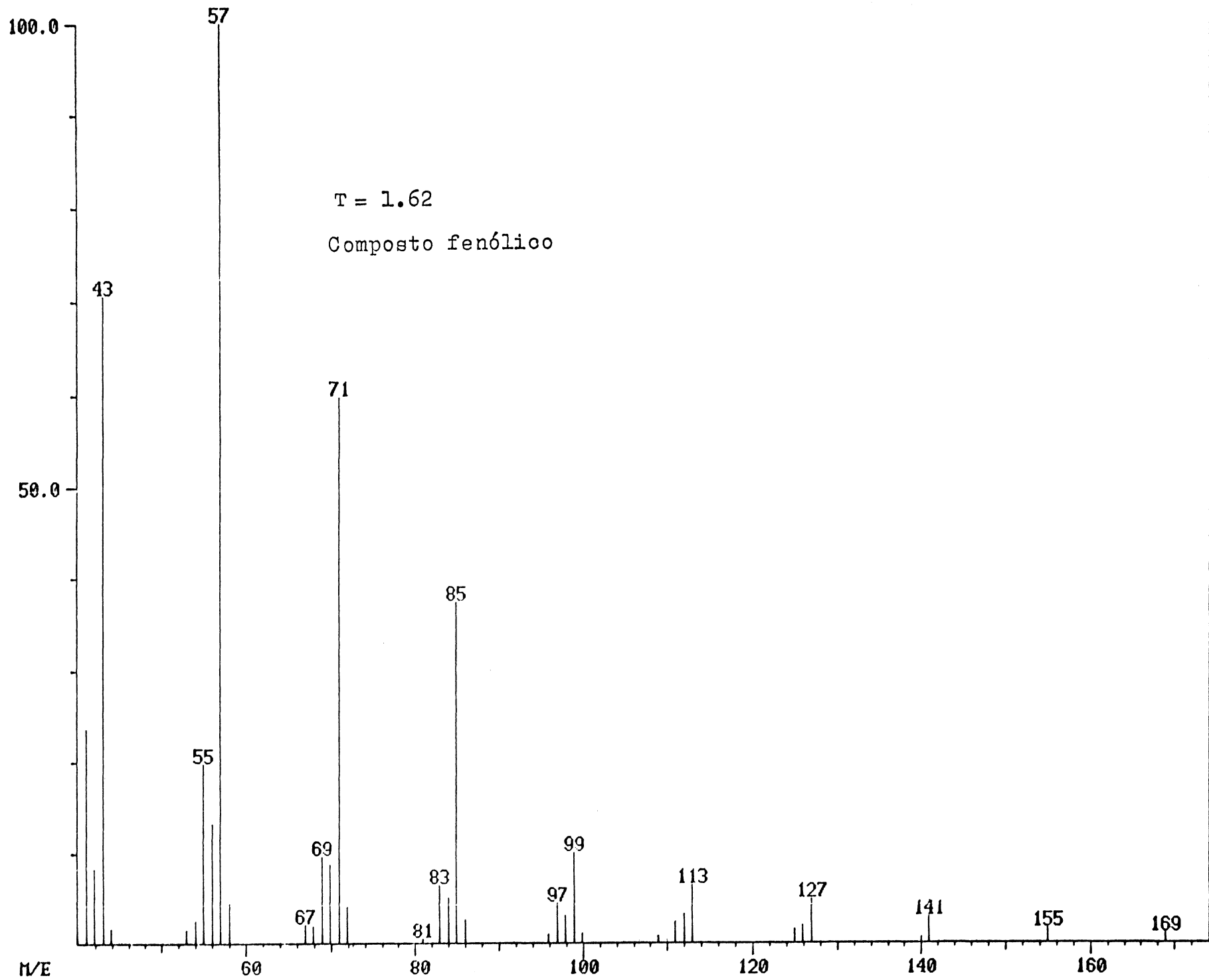
2,3,4-Me₃-D-Gal

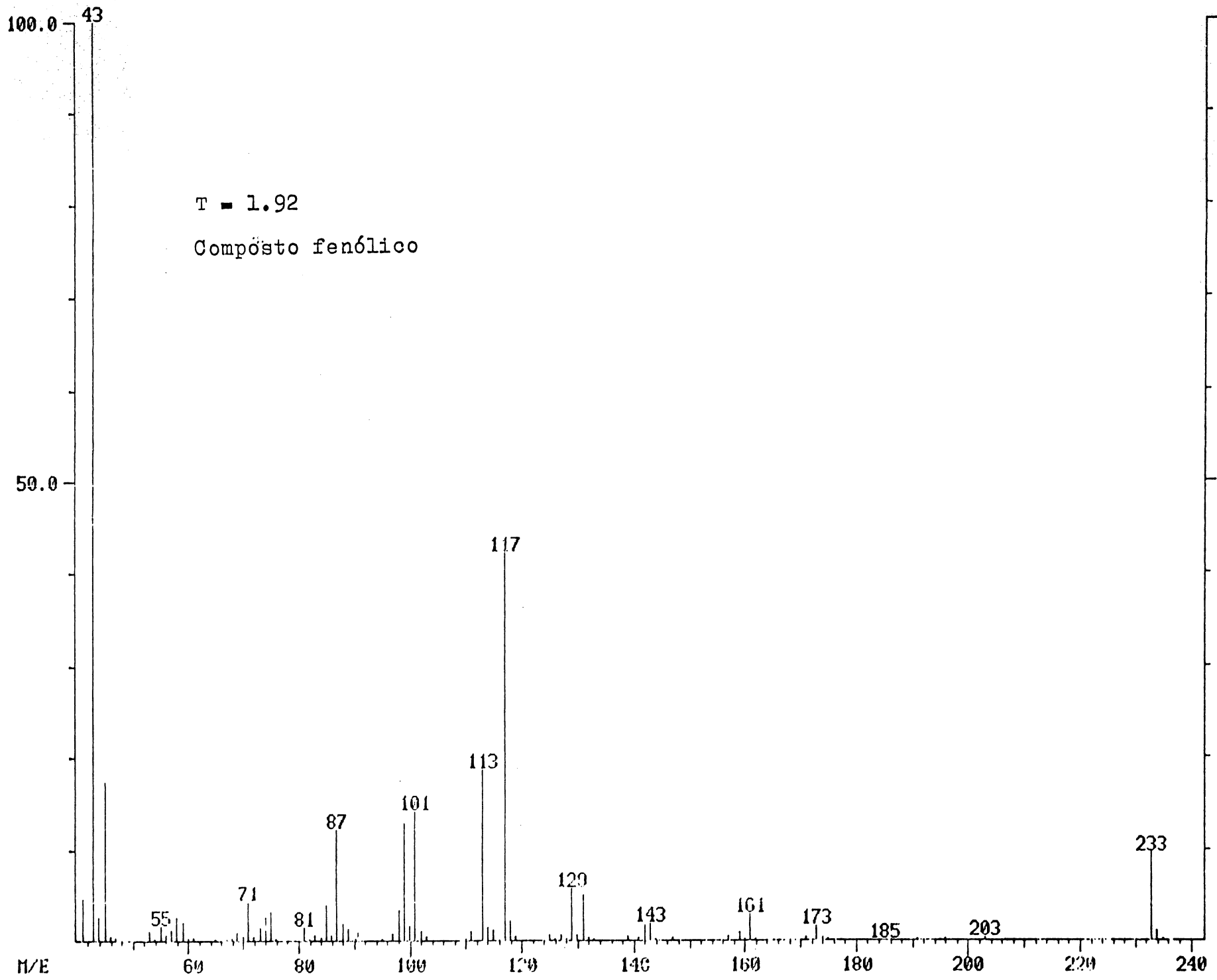


Fragmentação de massa dos derivados metilados do
composto fenólico.





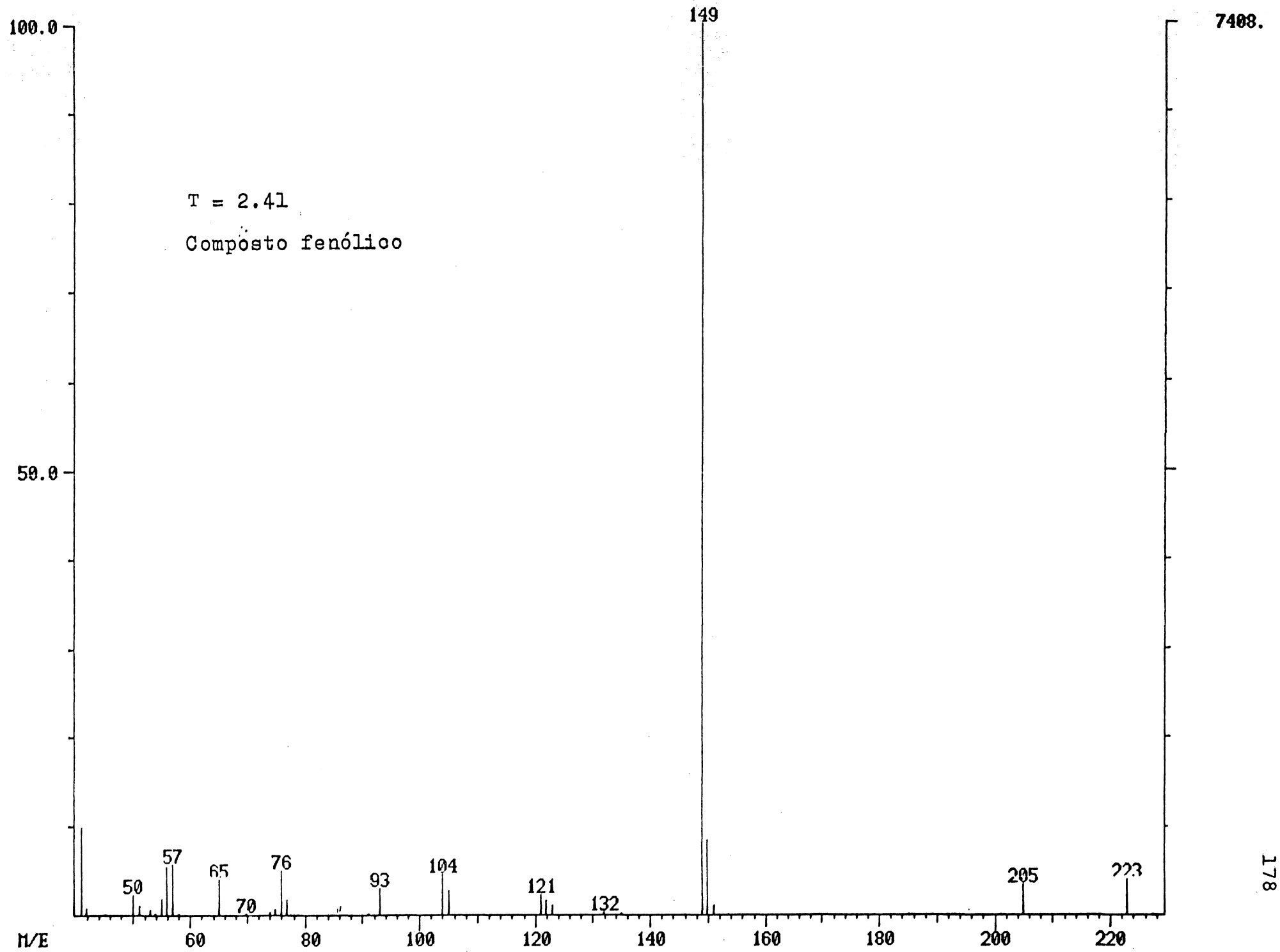


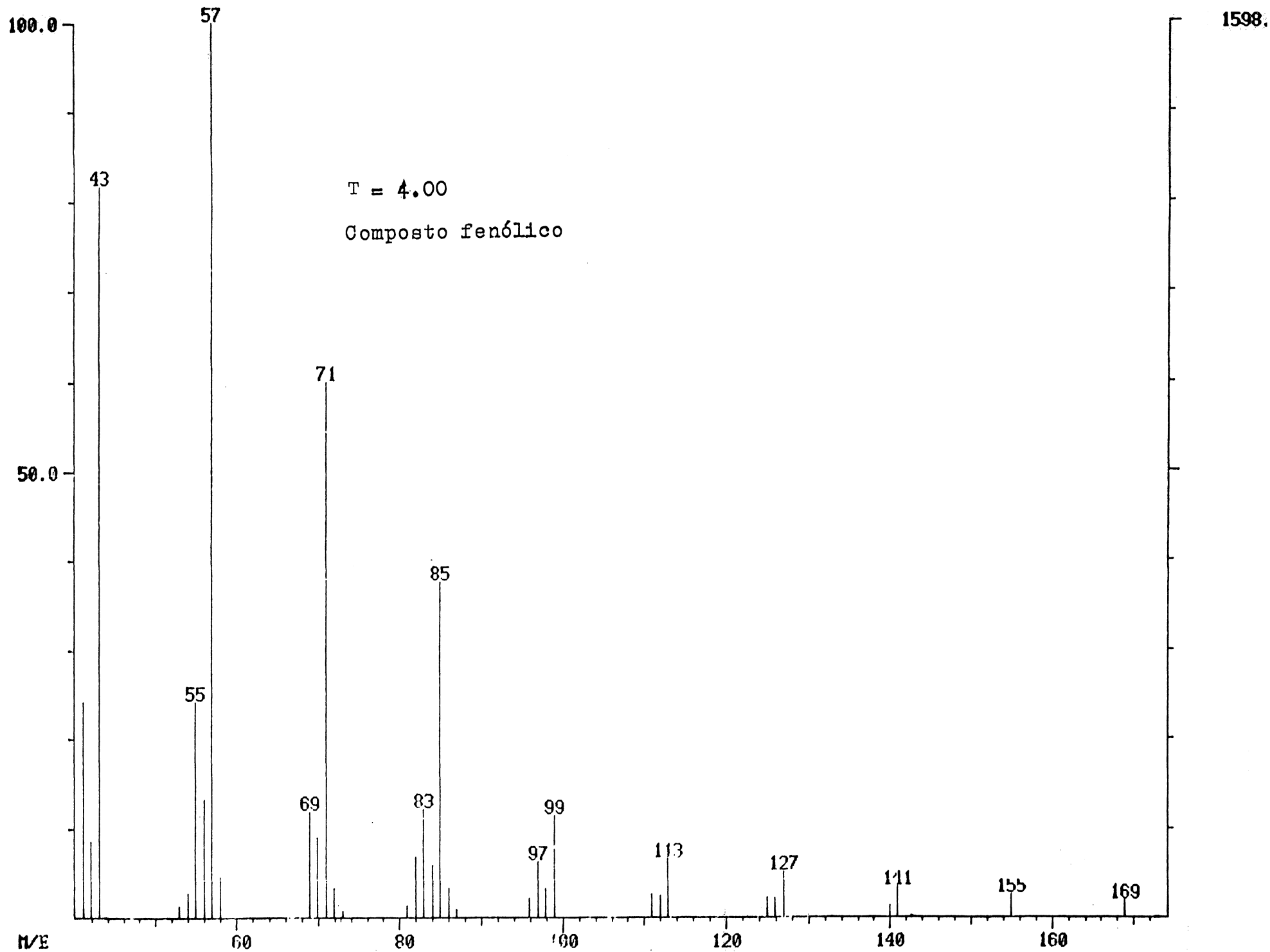


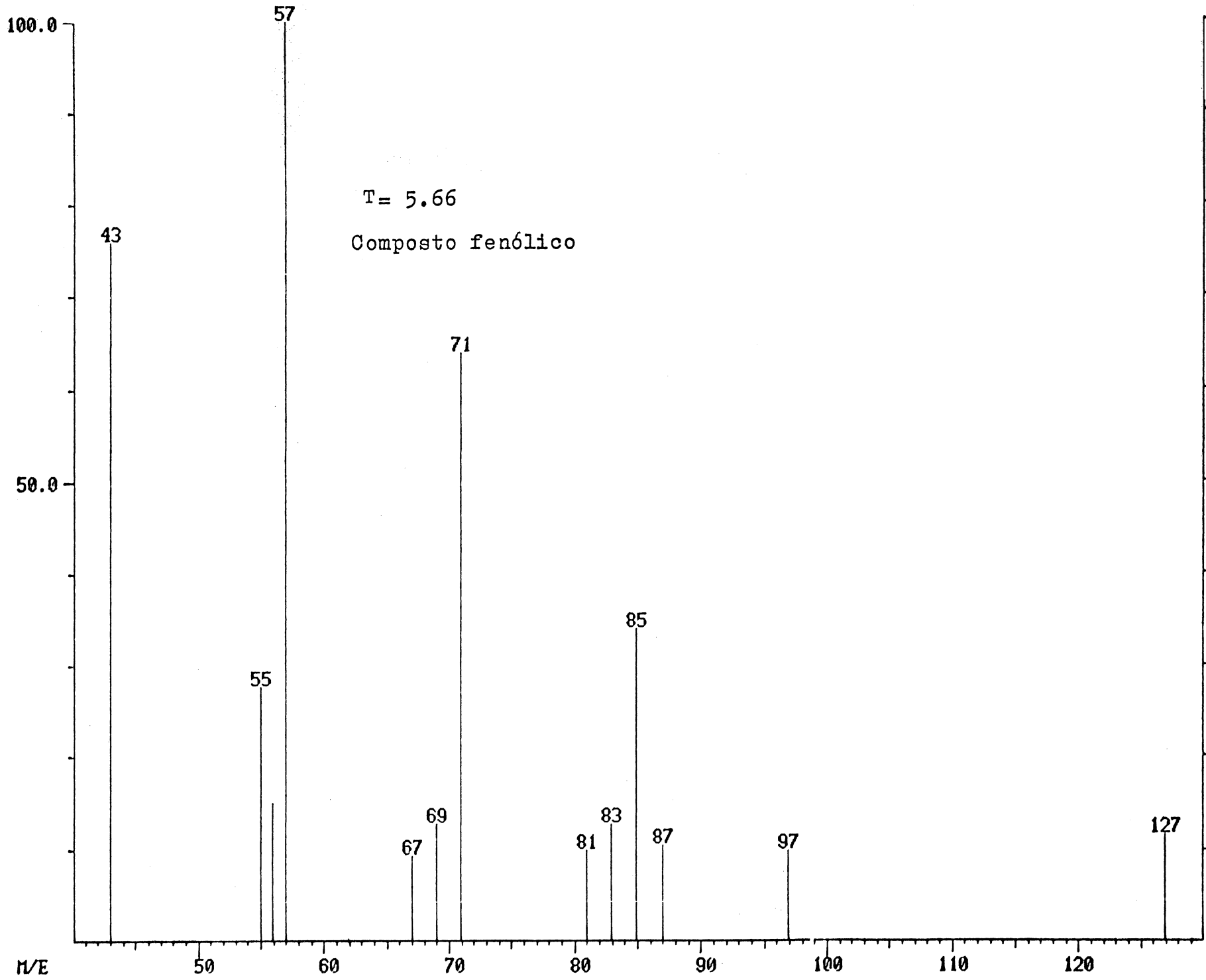
T = 1.92

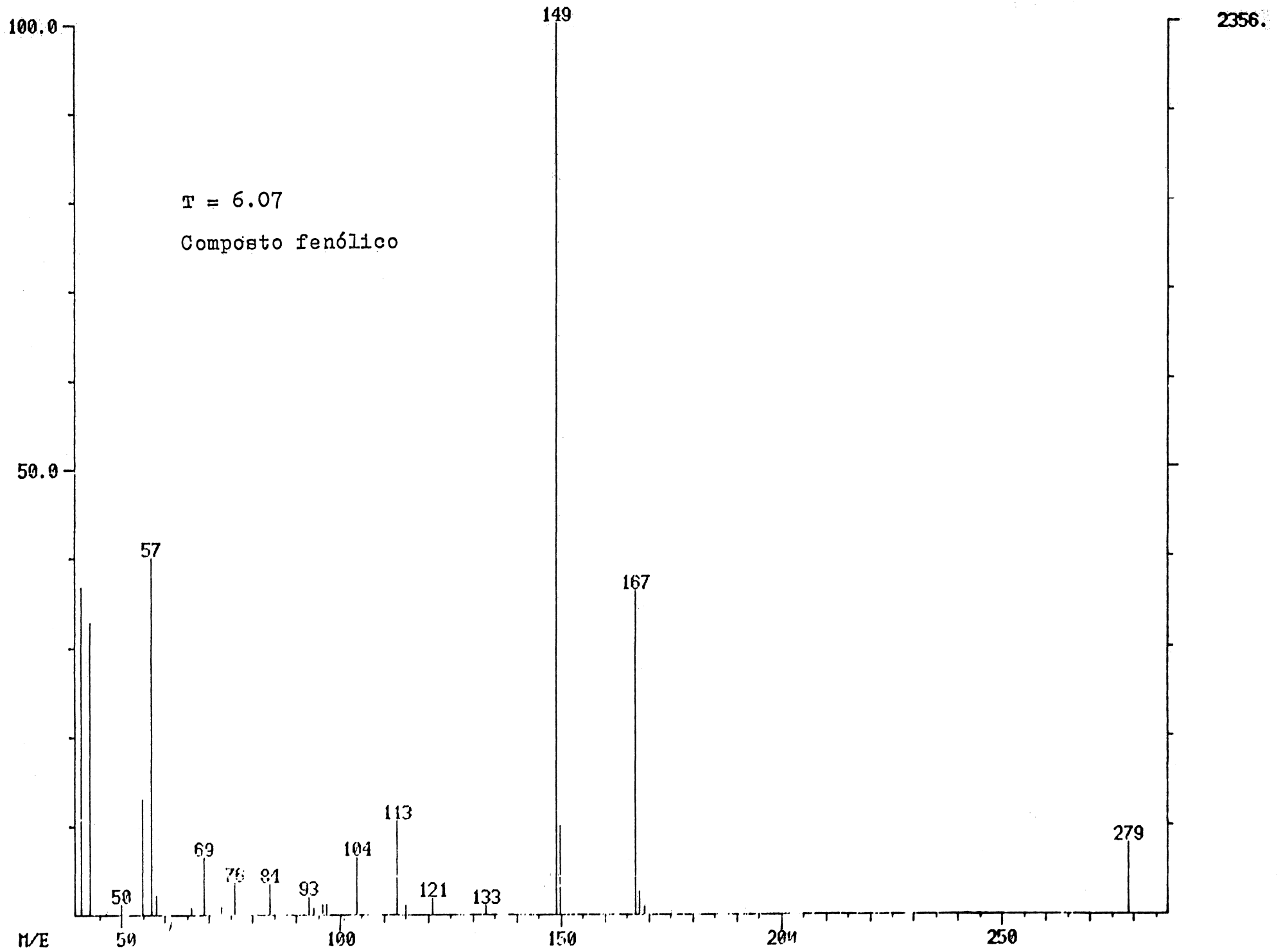
Compôsto fenólico

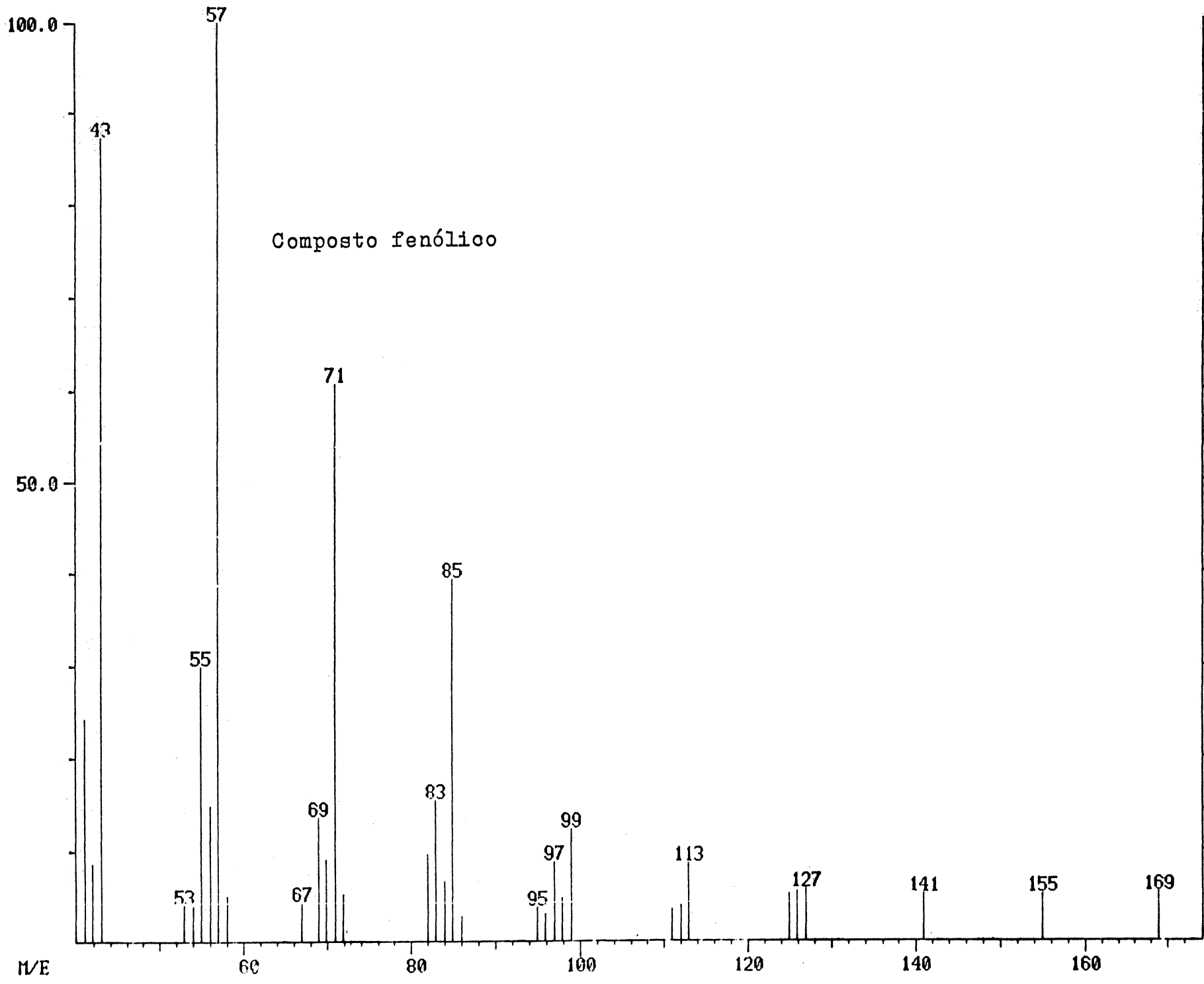
31104.











Composto fenólico