

ANA PAULA BUSATO

**XILOGLUCANA FUCOSILADA
DE FOLHAS DE *Hymenaea courbaril* (JATOBÁ)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

CURITIBA

2004

ANA PAULA BUSATO

**XILOGLUCANA FUCOSILADA
DE FOLHAS DE *Hymenaea courbaril* (JATOBÁ)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

CURITIBA

2004

ANA PAULA BUSATO

XILOGLUCANA ESTRUTURAL
de *Hymenaea courbaril* (JATOBÁ)

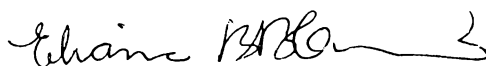
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica) no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:



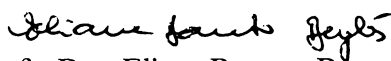
Prof. Dra. Fany Reicher (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná



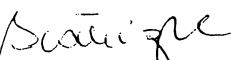
Prof. Dr. Philip Albert James Gorin
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dra. Eliana Beleski Borba Carneiro
Departamento de Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dra. Eliana Barreto Bergter
Departamento de Microbiologia Geral
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Curitiba, 17 de fevereiro de 2004.

Orientadora: Profa. Dra. Fany Reicher
Co-orientadora: Profa. Dra. Carem Gledes Vargas-Rechia

“Não ande somente por caminhos já traçados. Eles conduzem somente até onde os sonhos de outros chegaram.”

A. Graham Bell

*Ao Marcos por sua paciência, carinho e incentivo.
Pela inspiração em seu exemplo de determinação e
persistência. Com todo meu amor.*

*Aos meus queridos pais Maria Rosa e Paulo, por seu
imenso amor, pelo apoio em todos os momentos e
pelo exemplo de vida a ser seguido.*

*Aos meus irmãos, Carlos Eduardo e Juliana, pelo
carinho e estímulo, e principalmente pela nossa
união.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Fany Reicher, por seu incentivo, entusiasmo com a pesquisa, e por seu exemplo de firmeza e de dedicação ao trabalho. Pelos laços de carinho e confiança que se formaram entre nós durante estes anos. Meus sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Carem G. Vargas Rechia, pela dedicação e orientação em importantes etapas deste trabalho. Pela atenção dispensada durante o período em Ribeirão Preto.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação, representada pelas Profas. Dras. Fany Reicher, Maria Benigna Martinelli de Oliveira e Leda Chubatsu durante meu período de permanência no Departamento, pela dedicação.

Ao Prof. Dr. Philip A .J. Gorin, por ter gentilmente cedido os padrões de Me₂-xilose, e pelas amostras para análise ESI-MS enviadas ao Canadá.

À professora Maria B. M. Oliveira, pela disponibilidade da realização dos experimentos de atividade biológica. À Mariana Piemonte pela gentileza e auxílio durante estes experimentos.

À banca examinadora interna, composta pelos Profs. Drs .Philip A .J. Gorin e Maria Rita Sierakowski pelas sugestões pertinentes ao enriquecimento da tese.

Ao Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge, pela atenção e pelas produtivas discussões realizadas durante os experimentos na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica (São Paulo-SP). Por ter gentilmente doado anticorpo CCRC-M1 e a enzima endoglucanase de *Trichoderma viride* (MEGAZYME).

Ao Prof. Dr. Edilberto R. Silveira e ao Ms. Daniel E. Uchoa, do CENAUREMN (Centro Nordestino de Uso e Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, UFC, Fortaleza, Ceará, pelas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, pelas sugestões e atenção durante os experimentos Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), USP. Por gentilmente ter doado o anticorpo α -camundongo~biotina e a estreptovidina marcada com peroxidase.

Ao Dr. José César Rosa, do Laboratório de Química de Proteínas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela atenção e análises de ESI-MS.

Ao Dr. Schüle, NOVO NORDISK, Dinamarca (in memoriam) por ter cedido enzima endoxiloglucanase II, XG5, de *A. aculeata*.

À Farmacêutica Ieda M. R. Prado, da disciplina de Bioquímica, FCFRP, USP, por todas as sugestões quanto às análises em HPLC, pelo auxílio e atenção durante a realização dos ensaios em células vegetais.

À Farmacêutica Ana Elisa C. S. Azzolini, da disciplina de Bioquímica, FCFRP, USP, pela preparação e imunodifusão de anticorpos anti-neoglicoproteína, bem como pelo auxílio nos ensaios de ELISA. Pela gentileza e atenção prestadas durante a realização destes experimentos.

À Farmacêutica Neife A. G. Santos, do Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas, FCFRP, USP, pelas análises de GC-MS.

Ao César A. Tischer pelas análises e discussão dos experimentos de RMN e pelo auxílio nas análises de ESI-MS.

Ao Lauro Souza pela atenção e pelas análises de GC-MS.

À amiga Andreia Tisciane de Carvalho Capeline, por me ensinar uma outra forma de encarar a vida, pelas ótimas conversas que sempre tivemos.

À amiga Luciane Lazarini, por sua sincera amizade que resiste até a distância e ao tempo. Por todos os bons momentos que passamos no laboratório e também fora dele.

À amiga Gisele E. Peressutti, pelo seu carinho e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao amigo Renato Boichichio, pelo companheirismo.

Ao amigo Adriano Viana pelo seu carinho e pelas conversas bem-humoradas.

À Carmem L. Petkowicz e Eliana Beleski Borba Carneiro por seu auxílio e amizade.

À Silvia Schaefer e Juan Carlos Sabbi pelo carinho e amizade que mantemos mesmo não trabalhando mais juntos.

Ao Rilton A. Freitas, Sandra Martin e Ana Cristina F. Britto, pela sincera amizade.

À Caroline G. Mellinger, Paula Faria, Rosiane Zibetti, Guilherme Sassaki, Sérgio Ascêncio, Fabíola Stevan, Ana Helena Gracher, Clarice Osaku, Cíntia Mara R. Oliveira, Rodrigo Vassoler, pelos momentos compartilhados e pela companhia nos almoços.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas: Isabela Fernandes, Ruth dos Santos, Marisa Kampfert e Thelma Assis, pela gentileza e competência.

À Sra. Marilza Lamour, secretária da pós-graduação em Bioquímica, pela atenção e por sua dedicação ao Departamento.

Aos professores, colegas pós-graduandos e funcionários e a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Xiloglucanas.....	2
1.2. Interação xiloglucana e microfibrilas de celulose.....	12
1.3. Xiloglucanas no processo de expansão celular.....	13
1.4. Oligossacarídeos livres relacionados às xiloglucanas.....	19
1.5. <i>N</i> -glicanas fucosiladas.....	24
1.6. <i>Hymenaea courbaril</i>	26
II. JUSTIFICATIVA.....	31
III. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral.....	34
3.2. Objetivos específicos.....	34
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Material e métodos gerais.....	36
4.2. Obtenção das folhas.....	37
4.3. Deslipidificação e despigmentação	37
4.4. Obtenção dos polissacarídeos das folhas.....	37
4.5. Cromatografia de troca-iônica das frações IHB e IIHB.....	38
4.6. Determinação da composição monossacarídica.....	38
4.6.1. Hidrólises ácidas totais.....	38
4.6.2. Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise.....	39
4.7. Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC)	39
4.8. Análise de metilação do polissacarídeo.....	40
4.8.1. Hidrólise do polissacarídeo parcialmente metilado.....	41

4.8.2. Derivatização a acetatos de alditóis e aldonitrilos acetilados.....	41
4.9. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	42
4.10. Hidrólise enzimática da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i>	42
4.11. Cromatografia analítica do hidrolisado total.....	43
4.12. Cromatografia semi-preparativa do hidrolisado total	43
4.12.1. Cromatografia de gel permeação da fração H _{XG}	43
4.12.2. Cromatografia de gel permeação da fração H _{XG-1}	44
4.12.3. Isolamento dos oligossacarídeos por HPLC.....	44
4.13. Caracterização estrutural dos oligossacarídeos.....	44
4.14. Ensaios biológicos em células humanas.....	45
4.14.1. Meio de cultura celular.....	45
4.14.2. Preparação das amostras para os testes biológicos	45
4.14.3. Ensaio de células tumorais.....	46
4.14.4. Ensaios em células esplênicas de camundongos.....	46
4.14.5. Teste de viabilidade celular	47
4.15. Preparação da neoglicoproteína.....	47
4.16. Preparação e imunodifusão de anticorpos anti-neoglicoproteína	48
4.17. Preparação das células cultivadas de <i>Rubus fruticosus</i>	48
4.18. Preparação dos protoplastos.....	48
4.19. Preparação da fração microssomal.....	49
4.20. Extração das proteínas da membrana.....	49
4.21. Determinação da atividade de ligação a receptor de membrana por Elisa.....	50
4.22. Determinação da atividade de hidrolases.....	51
4.22.1. Bioensaios.....	51
4.22.2. Extração e dosagem das proteínas.....	51
4.22.3. Ensaios de atividade enzimática.....	52
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1. Obtenção e purificação do polissacarídeo de folhas de <i>H. courbaril</i>	54
5.2. Caracterização das unidades de xilose 4-O substituídas na xiloglucana.....	60
5.3. Obtenção e caracterização dos oligossacarídeos.....	79
5.3.1. Hidrólise enzimática.....	79
5.3.2. Cromatografia analítica.....	80

5.3.3. Cromatografia semi-preparativa.....	87
5.3.3.1. Fração oligossacarídica H _{XG-1}	87
5.3.3.2. Fração oligossacarídica H _{XG-2}	94
5.3.3.3. Fração oligossacarídica H _{XG-3}	104
5.3.3.4. Fração oligossacarídica H _{XG-4}	112
5.4. Ensaios biológicos em células humanas.....	113
5.5. Ensaios biológicos em células vegetais.....	115
5.5.1. Ligação do oligossacarí o XLFG à proteínas de membrana	116
4.5.2. Efeito do oligossacarídeo XLFG sobre a atividade de hidrolases.....	122
VI. CONCLUSÕES.....	127
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da xiloglucana das paredes celulares do tipo I.....	3
Figura 2. Modelo de parede celular primária do tipo I.....	5
Figura 3. Código de uma letra para as cadeias laterais das xiloglucanas com diferentes substituições.....	8
Figura 4. Estruturas simplificadas e nomenclatura para alguns oligossacarídeos relacionados às xiloglucanas.	9
Figura 5. A separação das microfibrilas guiada pela pressão osmótica nas células.....	15
Figura 6. Estrutura do oligossacarídeo XLFG.....	20
Figura 7. <i>Hymenaea courbaril</i>	28
Figura 8. Perfil de eluição da xiloglucana obtida das folhas de <i>H. courbaril</i> , através de HPSEC.....	58
Figura 9. Distribuição de massa molecular para as xiloglucanas de folhas e sementes de <i>H. courbaril</i>	59
Figura 10. Representação esquemática dos derivados 2,3-Me ₂ -xilitol e 3,4-Me ₂ -xilitol, reduzidos com NaBD ₄ e parcialmente acetilados.....	62
Figura 11. Espectro de GC-MS do derivado Me ₂ -xilitol da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i> metilada utilizando NaBD ₄	62
Figura 12. Espectro de GC-MS do padrão e do derivado 3,4-Me ₂ -xilose da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i> na forma de aldonitrilos acetilados parcialmente metilados	64
Figura 13. Espectro de GC-MS do padrão e do derivado 2,3-Me ₂ -xilose da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i> na forma de aldonitrilos acetilados parcialmente metilados	65
Figura 14. Integração da região anomérica do espectro de ¹ H-RMN da xiloglucana em aparelho BRUKER DRX-400.....	67
Figura 15. Espectro de HMQC da xiloglucana fucosilada e ampliação da região anomérica, em aparelho BRUKER DRX-400.....	69
Figura 16. Espectro de HMQC da xiloglucana fucosilada e ampliação da região de 55 a 85 ppm, em aparelho BRUKER DRX-400.....	70
Figura 17. Espectro de COSY da xiloglucana fucosilada em aparelho BRUKER DRX-400.....	71

Figura 18. Espectro de (A) TOCSY e (B) NOESY da xiloglucana em aparelho BRUKER DRX-400.....	72
Figura 19. Espectro de HMQC da xiloglucana e ampliação da região de 60 a 85 ppm, em aparelho BRUKER DRK 500.....	74
Figura 20. Espectro de TOCSY da xiloglucana e ampliação da região de 3,2 a 4,2 ppm, em aparelho BRUKER DRK 500.....	75
Figura 21. Motivos estruturais da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i>	77
Figura 22. Curva de hidrólise da fração H _{XG}	79
Figura 23. Perfil de eluição das frações H _{XG} e H _{XG} ' por HPAEC-PAD	81
Figura 24. Perfil de eluição da fração H _{XG} ' por HPAEC-PAD, submetida a 36, 60 e 84 horas de hidrólise.....	83
Figura 25. Espectro de ESI-MS do hidrolisado H _{XG}	85
Figura 26. Espectro de ESI-MS do hidrolisado H _{XG} '	85
Figura 27. Perfil de eluição do hidrolisado H _{XG} em BioGel P-2	87
Figura 28. Perfil de eluição da xiloglucana e fração H _{XG-1} obtida das folhas de <i>H.courbaril</i> , através de HPSEC	88
Figura 29. Perfil de eluição da xiloglucana e fração H _{XG-1} obtida das sementes de <i>H. courbaril</i> , através de HPSEC.....	88
Figura 30. Raio de giro em função da massa molecular para a xiloglucana de folhas e de sementes de <i>H. courbaril</i>	90
Figura 31. Perfil de eluição da xiloglucana e da fração H _{XG-1} das folhas de <i>H. courbaril</i> , em BioGel P-60.....	91
Figura 32. Perfil de eluição da xiloglucana e dos picos a,b,c da fração H _{XG-1} obtida das folhas de <i>H. courbaril</i> , através de HPSEC	91
Figura 33. Espectro de ESI-MS da fração oligossacarídica H _{XG-2}	94
Figura 34. Perfil de eluição da fração oligossacarídica H _{XG-2} em HPLC.....	95
Figura 35. Espectro de ESI-MS do pico 35 da fração oligossacarídica H _{XG-2}	95
Figura 36. Espectro de ESI-MS do oligossacarídeo XLFG	97
Figura 37. Espectro de HMQC do oligossacarídeo XLFG e ampliação da região anomérica	98
Figura 38. Espectro de HMQC do oligossacarídeo XLFG e ampliação da região de 55 a 85 ppm.....	99

Figura 39. Espectro de TOCSY do oligossacarídeo XLFG	101
Figura 40. Estrutura do oligossacarídeo XLFG	103
Figura 41. Espectro de ESI-MS da fração oligossacarídica H _{XG-3}	104
Figura 42. Perfil de eluição da fração oligossacarídica H _{XG-3} em HPLC.....	104
Figura 43. Espectro de ESI-MS do oligossacarídeo XXXG	105
Figura 44. Integração da região anomérica do espectro de ¹ H-RMN do oligossacarídeo XXXG	106
Figura 45. Espectro de HMQC do oligossacarídeo XXXG e ampliação da região anomérica.....	107
Figura 46. Espectro de HMQC do oligossacarídeo XXXG e ampliação da região de 55 a 80 ppm.....	108
Figura 47. Espectro de TOCSY do oligossacarídeo XXXG.....	109
Figura 48. Estrutura do oligossacarídeo XXXG	110
Figura 49. Espectro de ESI-MS da fração oligossacarídica H _{XG-4}	113
Figura 50. Avaliação do crescimento de células tumorais humanas B16F10 (melanoma)....	110
Figura 51. Determinação da viabilidade células esplênicas.....	114
Figura 52. Teste da eficiência do anticorpo monoclonal de murina CCRC-M1 em reconhecer a neoglicoproteína H _{XG-F} ~ BSA.....	119
Figura 53. Interação do oligossacarídeo XLFG à proteínas de membrana plasmática de <i>Rubus fruticosus</i>	121
Figura 54. Curva de dose dependência para a ativação da α-D-xilosidase, β-D-galactosidase e α-L-fucosidase, induzida pelo decassacarídeo XXFG.....	123
Figura 55. Efeito do oligossacarídeo XLFG sobre a indução da α-D-xilosidase	125
Figura 56. Efeito do oligossacarídeo XLFG sobre a indução da α-L-fucosidase	125

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Rendimento e determinação de carboidratos e proteínas das frações de hemicelulose B obtidas das folhas de <i>H. courbaril</i>	56
Tabela II. Composição monossacarídica das frações de hemicelulose B obtidas das folhas de <i>H. courbaril</i>	56
Tabela III. Composição monossacarídica das xiloglucanas obtidas por fracionamento em DEAE-Trisacryl Plus M	58
Tabela IV. Análise de metilação da xiloglucana das folhas de <i>Hymenaea courbaril</i>	61
Tabela V. Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H -RMN da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i>	75
Tabela VI. Proporção dos oligossacarídeos obtidos através de hidrólise enzimática da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i> e quantificados por HPAEC-PAD.....	81
Tabela VII. Proporção dos oligossacarídeos obtidos através de hidrólise da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i> e quantificados por ESI-MS.....	86
Tabela VIII. Composição em açúcares neutros das frações a, b e c obtidas a partir da fração H _{XG-1}	92
Tabela IX. Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H -NMR do oligossacarídeo XLFG	102
Tabela X. Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H -RMN do oligossacarídeo XXXG.....	110

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimento de extração para obtenção da xiloglucana de folhas do jatobá.....	55
Esquema 2. Procedimento do ensaio imuno-enzimático realizado para avaliar a eficiência do anticorpo monoclonal murino CCRC-M1 em reconhecer a neoglicoproteína H _{XG-F} ~ BSA.....	118
Esquema 3. Procedimento do ensaio imuno-enzimático realizado para testar a possível ligação do oligossacarídeo XLFG à proteínas de membrana plasmática de <i>Rubus fruticosus</i>	120

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA.....	albumina de soro bovino
CHAPS.....	3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato
COSY.....	“correlation spectroscopy”
¹³ C-RMN.....	ressonância magnética nuclear de carbono treze
δ (ppm).....	deslocamento químico
2,4-D.....	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DP.....	grau de polimerização
DTT.....	ditiotretol
EDTA.....	Ácido etilenotetracético
EG.....	endoglucanase
ELISA.....	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ensaio imuno-enzimático em fase sólida)
ESI-MS.....	espectrometria de massa com ionização por “spray” de elétrons
GC-MS.....	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GLC.....	cromatografia líquido-gasosa
HA.....	hemicelulose A
HB.....	hemicelulose B
HMQC.....	“heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy”
HPSEC.....	cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
HPAEC-PAD.....	“high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection”
¹ H-RMN.....	ressonância magnética nuclear de próton
H _{XG-S}	oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática da xiloglucana de sementes de <i>H. courbaril</i>

H _{XG-F}	oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática da xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i>
IR.....	índice de refração
MALLS.....	espalhamento de luz em multiângulos
MTT.....	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil-2]-2,5-difenil tetrazolio
M _w	massa molecular ponderal média
M _n	massa molecular numérica média
nd.....	não determinado
NOESY.....	“nuclear overhauser effect spectroscopy”
PBS.....	Solução salina tamponada
PMSF.....	Fluoreto de fenil metil sulfonil
RG.....	ramnogalacturonana
TLC.....	cromatografia em camada delgada
XET.....	xiloglucana endotransglicosilase
XG.....	xiloglucana
XG5.....	endoxiloglucanase II
XG-S.....	xiloglucana de sementes de <i>H. courbaril</i>
XG-F.....	xiloglucana de folhas de <i>H. courbaril</i>
Tris.....	(hidroximetil) aminometano

RESUMO

A xiloglucana fucosilada de *Hymenaea courbaril*, foi obtida por extração alcalina das folhas deslipidificadas, deslignificadas e despectinizadas. O polissacarídeo, purificado por cromatografia de troca-iônica, apresentou-se homogêneo por análise de HPSEC-MALLS. O índice de polidispersão e a conformação das xiloglucanas das folhas, bem como daquela obtida das sementes de *H. courbaril*, foram determinados, sendo que os valores de $R_G \times M_w$ obtidos indicam que o polissacarídeo estrutural apresenta forma em bastão e é mais polidisperso do que o de reserva, que apresenta conformação emaranhado ao acaso. A estrutura fina da xiloglucana fucosilada foi determinada. A análise de GC-MS dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, utilizando-se NaBD₄ na etapa de redução, demonstrou a presença do derivado 2,3-Me₂-xilose, além do 3,4-Me₂-xilose normalmente encontrado. Este resultado foi confirmado através da obtenção de aldonitrilos acetilados parcialmente metilados. RMN bidimensional indicou que as unidades de xilose substituídas somente por galactose apresentam ligação em O-2, enquanto que as unidades substituídas pelo dissacarídeo fucosil-galactose provavelmente apresentam a substituição em O-4. A presença destas unidades de xilose substituídas em O-4 é inédita em xiloglucanas, e indica uma nova galactosil transferase participando da biossíntese destas moléculas. Oligossacarídeos foram obtidos por hidrólise enzimática da xiloglucana estrutural, com *endo*- β (1 $\rightarrow$ 4)glucanase de *Trichoderma viride* e endoxiloglucanase de *A. aculeata*. O material hidrolisado foi submetido a cromatografia analítica e analisado por HPAEC-PAD e ESI-MS, sendo que os oligossacarídeos XXXG, XLFG e XXFG correspondem a 90% do hidrolisado, em proporção de 1,3: 1,3: 1,0. A alta proporção do oligossacarídeo XLFG difere do esperado para xiloglucanas de parede celular primária do tipo I. O material hidrolisado foi fracionado por cromatografia de gel-permeação semi-preparativa BioGel P-2, sendo obtidas quatro frações: H_{XG-1}, H_{XG-2}, H_{XG-3}, H_{XG-4}. A fração H_{XG-1} (1,5%) , eluída no volume morto da coluna, é constituída por fragmentos de xiloglucana. Estes foram separados em BioGel P-60, e apresentaram maiores proporções relativas de galactose e fucose em comparação com o polissacarídeo, indicando que em H_{XG-1} predominam cadeias laterais galactosiladas e fucosiladas. As frações H_{XG-2}, H_{XG-3} foram submetidas à cromatografia preparativa por HPLC em coluna C-18. A partir da fração H_{XG-3} foi obtido o oligossacarídeo purificado XXXG, analisado por RMN bidimensional. A cromatografia da fração H_{XG-2} forneceu dois picos, sendo um deles correspondente ao XLFG purificado. A análise de RMN bidimensional deste oligossacarídeo comprova o mesmo padrão de substituição para as unidades de xilose encontrado no polissacarídeo. As xiloglucanas das folhas e das sementes, bem como seus respectivos oligossacarídeos, não apresentaram citotoxicidade sobre as células tumorais humanas (melanoma), nem induziram a proliferação dos linfócitos T. O oligossacarídeo XLFG apresentou interação com proteínas isoladas da membrana plasmática de protoplastos de *Rubus fruticosus*, indicando a presença de receptores para o dissacarídeo na membrana. Além disso, aumentou a atividade α -D-xilosidase e α -L-fucosidase nestes protoplastos.

ABSTRACT

The fucosylated xyloglucan from *Hymenaea courbaril*, was obtained by alkaline extraction of defatted, delignified and pectin-free leaves. The polysaccharide, purified by ion-exchange chromatography, was homogeneous according to HPSEC-MALLS analysis. The polydispersity and the conformation of xyloglucan from the leaves, as well as that obtained from the seeds of *H. courbaril*, were determined. Its $R_G \times M_w$ indicated that the structural polysaccharide has a rod-like form and is more polydisperse than that of the reserve, with a random coil conformation. The fine structure of the fucosylated xyloglucan was determined. GC-MS analysis of partially *O*-methylated alditol acetates, using NaBD₄ in the reduction step, demonstrated the presence of a 2,3-Me₂-xilose derivative. This result was confirmed by analysis of partially *O*-methylated acetylated aldonitriles. Bidimensional RMN indicated that the units of xylose only substituted by galactose were O-2 substituted, while those units substituted by the disaccharide group fucosyl-galactose are probably O-4 substituted. The presence of the latter substitution is unique in xyloglucans, and indicates a new galactosyl transferase participating in the biosynthesis of these molecules. Oligosaccharides were produced by enzymatic hydrolysis of the structural xyloglucan with the *endo*-1,4- β -D-glucanase from *Trichoderma viride* and endoxyloglucanase from *A. aculeata*. The hydrolyzed material was analyzed by HPAEC-PAD and ESI-MS, where XXXG, XLFG and XXFG oligosaccharides corresponded to 90% of the total polysaccharide, in a ratio of 1,3: 1,3: 1,0. The high ratio of XLFG differs from that expected for type I primary cell wall xyloglucans. The hydrolyzed material was fractionated by semi-preparative gel-permeation chromatography on Biogel P-2, yielding four fractions: H_{XG-1}, H_{XG-2}, H_{XG-3}, H_{XG-4}. Fraction H_{XG-1} (1,5 %), eluted in the void volume of the column, was composed of fragments of xyloglucan. These were separated on Biogel P-60, and showed higher relative ratios of galactose and fucose compared to that of the polysaccharide, indicating that in H_{XG-1} galactosylated and fucosylated side chains predominate. Fractions H_{XG-2} and H_{XG-3} had been submitted to the HPLC preparative chromatography on a C-18 column. From fraction H_{XG-3}, purified oligosaccharide XXXG was obtained and analyzed by bidimensional NMR spectroscopy. Chromatography of fraction H_{XG-2} gave rise two peaks, one of them corresponding to the purified XLFG. NMR bidimensional analysis of this oligosaccharide, indicated the same xylosyl substitution pattern as found in the polysaccharide. The seed and leaf xyloglucans, as well as their respective oligosaccharides, were not cytotoxic for the tumor cells, nor induced proliferation of T lymphocytes. XLFG interacted with isolated plasma membrane proteins of *Rubus fruticosus* protoplasts, indicating the presence of receptors for the decasaccharide on the membrane. Moreover, it induced the activities α -D-xylosidase and α -L-fucosidase in these protoplasts.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Xiloglucanas

As xiloglucanas são indiscutivelmente importantes componentes das paredes celulares primárias, o que pode ser constatado pela sua ocorrência universal nas paredes dos vegetais superiores, sendo os principais polissacarídeos da parede celular primária de todas as dicotiledôneas (HAYASHI, 1989). Além deste papel estrutural na parede celular das plantas, as xiloglucanas apresentam função regulatória (McNEIL, DARVILL e FRY, 1984). A estrutura básica destes polímeros de parede celular compreende uma cadeia principal de unidades de glucose com ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Estas unidades de glucose podem estar substituídas por diferentes cadeias laterais. Fry (1989) ressalta que existe alguma regularidade na distribuição destas cadeias laterais ao longo da cadeia celulósica. Em geral, a cadeia principal está substituída por unidades de α -D-xilopirranose; estas últimas, por sua vez podem estar substituídas na posição O-2 por unidades de β -D-galactopirranose. Nas xiloglucanas de parede celular primária, algumas unidades de galactose são substituídas, também na posição 2, por unidades de fucose (Figura 1) (CARPITA e GIBEAUT, 1993), sendo por isso denominadas de xiloglucanas fucosiladas. Nestas xiloglucanas, quando não são extraídas com álcali, podem ser identificados grupos acetato unidos através de ligações éster às unidades de galactose (FRY, 1989; McNEIL et al., 1984).

Os oligossacarídeos relacionados às xiloglucanas são considerados oligossacarinas, pois regulam o crescimento celular (DARVILL et al., 1992). O notável decréscimo do conteúdo relativo de xiloglucana durante o período de crescimento e a rápida degradação das xiloglucanas após tratamento com auxina, sugere que estes polissacarídeos apresentam um papel importante na expansão celular e portanto constituem componentes-chave das paredes celulares primárias (HAYASHI, 1989). As xiloglucanas na parede celular primária encontram-se associadas as microfibrilas de celulose formando uma rede de polissacarídeos, que é considerada como o principal sistema de controle da expansão celular (ZABACKIS et al., 1995).

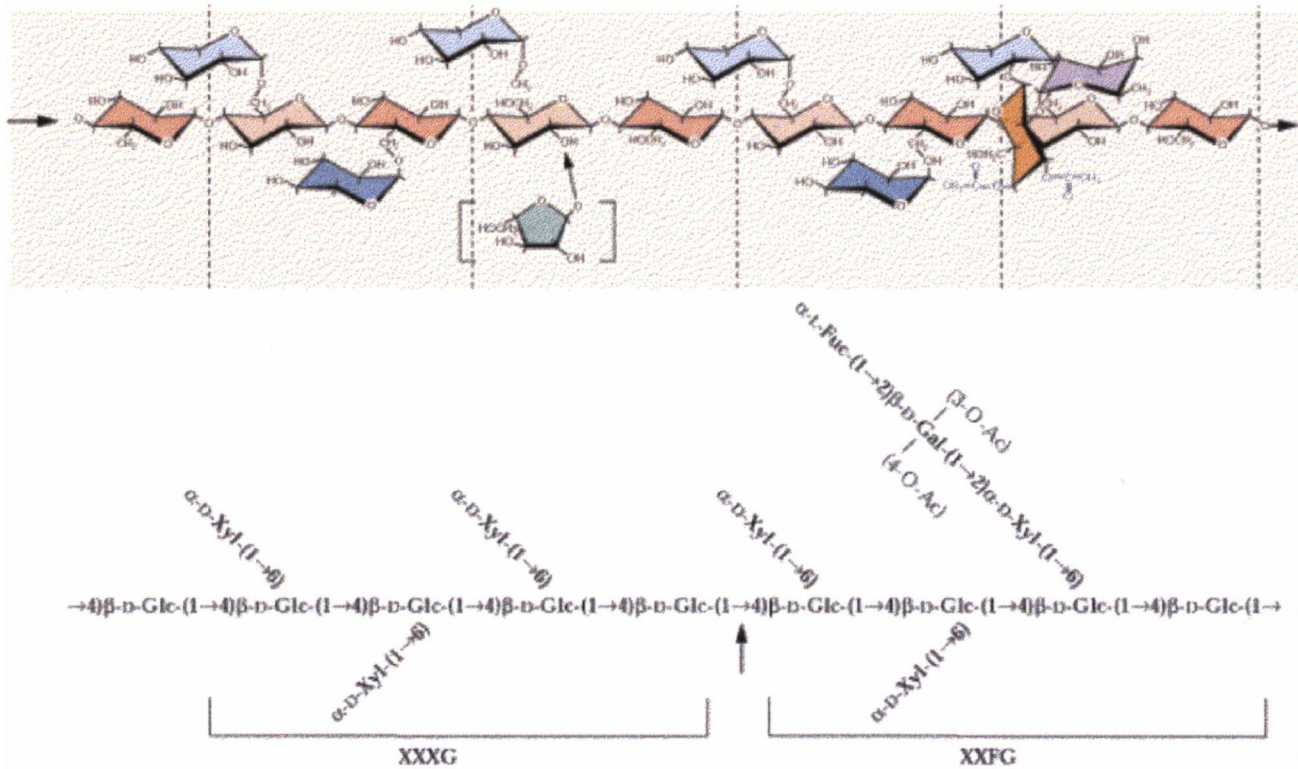


Figura 1. Estrutura da xiloglucana de parede celular do tipo I (CARPITA e McCANN, 2000).

O primeiro modelo completo para a estrutura das paredes celulares primárias, onde a associação entre a celulose e a xiloglucana foi sugerida, foi proposto por Albersheim em 1973, utilizando-se cultura de células em suspensão de *Acer pseudoplatanus* (KEEGSTRA et al., 1973; TALMADGE et al., 1973). Neste modelo as xiloglucanas estariam ligadas à celulose através de pontes de hidrogênio, enquanto que associações covalentes conectariam outros polissacarídeos como ramnogalacturonanas, arabinogalactanas e as próprias xiloglucanas, bem como uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (BAUER et al., 1973; ALBERSHEIM, 1975).

O modelo para parede celular primária atualmente mais aceito foi sugerido por Carpita e Gibeaut (1993), que propuseram dois tipos de estrutura para paredes celulares primárias das plantas angiospermas. A primeira, chamada parede do tipo I, representa a parede das dicotiledôneas em geral e algumas monocotiledôneas, sendo as xiloglucanas o seu principal componente não-celulósico. A segunda, corresponde à parede das Poáceas e abriga a maior parte das famílias das monocotiledôneas, sendo chamadas de paredes do tipo II. Nestas as glucuronoarabinoxilanas são os principais polímeros interconectados as microfibrilas de celulose. Recentemente, Boichichio (2003) caracterizou os principais

polissacarídeos da parede primária de *Araucaria angustifolia*, uma gimnosperma nativa do sul do Brasil, apresentando-se esta similar àquelas espécies descritas para parede celular do tipo I.

Carpita e Gibeaut (1993), para fins didáticos, dividiram as paredes celulares primárias do tipo I em três domínios estruturais independentes (Figura 2). O primeiro domínio, que constitui aproximadamente 50% da parede, é formado pela rede celulose-xiloglucana. As xiloglucanas podem se ligar firmemente à superfície das microfibrilas de celulose e serem longas o suficiente para ligar duas ou mais microfibrilas, formando uma rede interconectada. Outros polissacarídeos hemicelulósicos podem estar presentes, mas em proporções bem menores (CARPITA e GIBEAUT, 1993; McCANN et al., 1995). Este primeiro domínio está embebido em um segundo domínio formado pela matriz de polissacarídeos pécticos (aproximadamente 30% da parede), o qual é independente, mas coexiste com o primeiro (CARPITA e GIBEAUT, 1993). O terceiro domínio é formado por proteínas estruturais, sendo a principal proteína estrutural a extensina, que pode formar pontes intermoleculares com outras proteínas sem necessariamente se ligar aos polissacarídeos (VARNER e LIN, 1989; CARPITA e GIBEAUT, 1993).

A estrutura das xiloglucanas de parede celular primária tem sido extensivamente revisada (McNEIL et al., 1984; HAYASHI, 1989; FRY, 1989) desde que este polissacarídeo foi inicialmente isolado de cultura de células em suspensão de *Acer pseudoplatanus* (BAUER et al., 1973). Geralmente, as xiloglucanas compreendem 20-25% das paredes primárias de dicotiledôneas e 2% das monocotiledôneas (McNEIL et al., 1984; FRY, 1989; HAYASHI, 1989; VARNER e LIN, 1989), sendo que foram identificadas também em gimnospermas (KAKEGAWA, EDASHIGE, ISHI, 1998; BOCHICCHIO, 2003).

As xiloglucanas também estão presentes em sementes de algumas espécies de dicotiledôneas. Como neste caso o polissacarídeo é utilizado pelo embrião, desaparecendo após a germinação, estes polímeros são considerados como carboidratos de reserva (HAYASHI, 1989), tal como o amido e as galactomananas. As xiloglucanas de reserva são também chamadas de amilóides devido a sua característica semelhante ao amido, que apresenta coloração azul após tratamento com uma solução de iodo/iodeto de potássio (GAILLARD, 1961; GAILLARD, THOMPSON e MORAK, 1969; KOOIMAN, 1960; KOOIMAN, 1961; KOOIMAN, 1967).

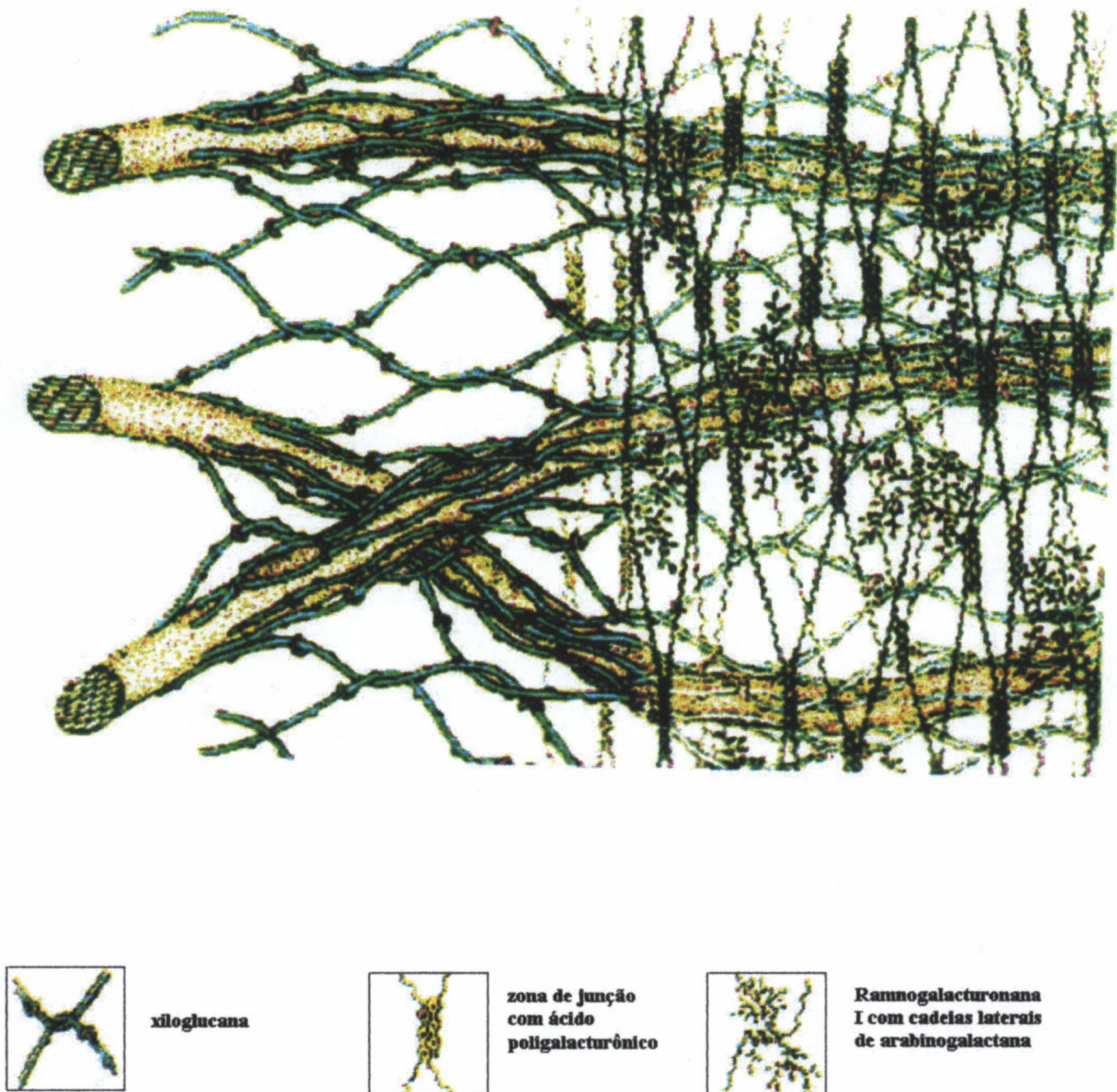


Figura 2. Modelo de parede celular primária do tipo I, mostrando as interações moleculares entre celulose, xiloglucanas e pectinas (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

A estrutura básica da xiloglucana de reserva é bastante semelhante ao do polissacarídeo estrutural, apresentando D-glucose, D-xilose e D-galactose em proporção de aproximadamente 4:3:1 (FRY, 1989; McNEIL et al., 1984; HAYASHI, 1989). A principal diferença entre estas duas xiloglucanas está na ausência de fucose no polissacarídeo da semente, na maior parte das espécies já investigadas, sendo exceções as xiloglucanas fucosiladas presentes no cotilédono de *Brassica campestris* (canola) (SIDDIQUI e WOOD, 1977) e de sementes de *Glycine max* (soja) (HUISMAN et al., 2000).

Os primeiros trabalhos que descrevem as xiloglucanas foram realizados por Kooiman (1957, 1967), que identificou a sua presença em sementes de diversas espécies de plantas, tais como *Tamarindus indica* (tamarindo), *Tropaeolum majus*, *Cyclamen hydr.*, *Impatiens balsamina*, *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Schotia latifolia* e *Annona muricata*.

Em comum com muitos polissacarídeos extraídos de plantas, as xiloglucanas de sementes apresenta potencial para importantes aplicações industriais, particularmente na indústria farmacêutica e de alimentos, na liberação controlada de drogas e modificação da textura, respectivamente (WANG et al., 1997).

A xiloglucana de sementes de tamarindo, quando parcialmente degradada por β -galactosidase, exibe capacidade de formação de gel em solução aquosa diluída, sendo que a temperatura de transição sol-gel varia com o grau de eliminação de galactose. O uso potencial deste gel para a liberação controlada de drogas administradas por via intraperitoneal (SUISHA et al., 1998), retal (MIYAZAKI et al., 1998), oral (KAWASAKI et al., 1999; MIYAZAKI et al., 2001) ocular (MIYAZAKI et al., 2001) e percutânea (TAKAHASHI et al., 2002) foi investigado.

Onweluzo, Armes e Tharanathan (2002) descrevem a presença de polissacarídeos viscosos em sementes de *Detarium microcarpum* e *Mucuna flagellipes* (mucuna), que foram caracterizados como xiloglucanas. A farinha de sementes destas espécies é utilizada em países africanos para espessar alimentos, pois as xiloglucanas de reserva são em geral polissacarídeos altamente viscosos. As propriedades reológicas das xiloglucanas de sementes de *Tamarindus indica* (GIDLEY et al., 1991; SIMS et al., 1998) e de *Detarium senegalense* (WANG et al., 1997) já foram investigadas.

As xiloglucanas, de reserva ou estrutural, podem ser derivatizadas em compostos semelhantes àqueles obtidos a partir da celulose, tais como metilcelulose, hidroxipropilcelulose, carboximetilcelulose. Estes derivados podem ser utilizados como agentes espessantes, emulsificantes ou modificadores de textura (WATT et al., 1999). Além

disso, a interação de xiloglucana com carboximetilcelulose indica que podem ser utilizadas para modificar a viscosidade de derivados solúveis de β -glucanas e β -xilanas (HAYASHI, MARSDEN e DELMER, 1987).

Lima, Oliveira e Buckeridge (2003) analisaram os efeitos de xiloglucanas sementes de diferentes espécies como aditivos na fabricação de papel, e verificaram que estes polissacarídeos melhoraram as propriedades mecânicas sem alterar as propriedades ópticas, tais como a opacidade.

Oosterveld et al. (2003) analisaram os polissacarídeos das sementes de *Coffea arabica* verdes e torradas, e verificaram que ocorreu decréscimo no grau de ramificação e na massa molecular das xiloglucanas, galactomananas e arabinogalactanas. Os rendimentos das extrações dos polissacarídeos aumentaram muito nas sementes torradas. Foi sugerido que a degradação das xiloglucanas durante a torrefação tem um importante papel no aumento da acessibilidade a matriz da parede celular. Shiga, Lajolo e Filisetti (2003) estudaram o efeito do tempo e condições de estocagem, sobre os polissacarídeos de sementes de *Phaseolus vulgaris*, e verificaram que ao contrário dos polissacarídeos pécticos as xiloglucanas não sofreram alterações.

Devido à complexidade das cadeias laterais, Fry et al. (1993) sugeriram uma nomenclatura para os oligossacarídeos obtidos a partir das xiloglucanas, que é amplamente empregada. De acordo com esta nomenclatura as cadeias laterais são nomeadas através das unidades monossacarídicas que não são substituídas, da esquerda para a direita. Assim sendo, as unidades de glucose da cadeia principal substituídas por xilose são especificadas pela letra X e as unidades não substituídas por G. São ainda empregados L (galactose), F (fucose), quando estes monossacarídeos aparecem como as unidades terminais das cadeias laterais. Quando a unidade redutora de cada oligossacarídeo está sob a forma reduzida acrescenta-se a terminação ol. Na Figura 3 estão as diversas cadeias laterais de xiloglucanas que já foram identificadas, bem como as respectivas letras que as codificam. Além daquelas citadas acima, foram descritas cadeias laterais codificadas por S (SIMS et al., 1996; YORK et al., 1996; VINCKEN et al., 1996), J (HANTUS et al., 1997), T (YORK et al., 1996) e A, B ou C (FRY et al., 1993). Os principais oligossacarídeos de parede celular primária do tipo I estão apresentados na Figura 4.

	α -L-Fucp 1 ↓ 2 β-D-Galp 1 ↓ 2 α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	β-D-Galp 1 ↓ 2 α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	α-L-Galp 1 ↓ 2 β-D-Galp 1 ↓ 2 α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	α-L-Araf 1 ↓ 2 α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	β-L-Araf 1 ↓ 3 α-L-Araf 1 ↓ 2 α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	α-D-Xylp 1 ↓ 6 β-D-Glcp	D-Glcp
G	F	L	X	J	S	T	A	B	C	Gol

Figura 3. Código de uma letra para as cadeias laterais das xiloglucanas com diferentes substituições (FRY et al., 1993). Para exemplificar, **F** significa uma unidade terminal de α -L-fucopiranoose, ligada a β -D-galactose, esta à α -D-xilose, unida a cadeia principal.

ESTRUTURA	NOMENCLATURA	
	ATUAL	ANTIGA
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \end{array}$	XXG	-
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \end{array}$	XXXG	XG7
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \text{Gal} \end{array}$	XXLG	XG8
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \text{Gal} \end{array}$	XLXG	XG8
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \uparrow \uparrow \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \text{Gal} \quad \text{Gal} \end{array}$	XLLG	XG9n
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \text{Gal} \\ \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \text{Fuc} \end{array}$	XXFG	XG9
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \uparrow \uparrow \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \text{Gal} \quad \text{Gal} \\ \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \text{Fuc} \end{array}$	XLFG	-

Figura 4. Estruturas simplificadas e nomenclatura para alguns oligossacarídeos relacionados às xiloglucanas. Nas estruturas, as setas indicam as ligações glicosídicas: $\rightarrow$, ligação β - $(1 \rightarrow 4)$; $\uparrow$, ligação α - $(1 \rightarrow 6)$; $\uparrow \uparrow$, ligação $(1 \rightarrow 2)$ (FRY et al., 1993).

As xiloglucanas foram divididas em 2 grupos fundamentais, segundo Vincken et al. (1997). O primeiro grupo foi chamado de poli-XXXG, pois 3 das 4 unidades de glucose da cadeia principal são substituídas por xilose em O-6. Neste grupo estão incluídas as xiloglucanas das gimnospermas e das angiospermas, sendo exemplos as xiloglucanas de sementes de dicotiledôneas, tais como a de *Tamarindus indica* (YORK et al., 1993) e de *Copaifera langsdorfii* (BUCKERIDGE et al., 1992). Uma exceção é a xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* (BUCKERIDGE et al., 1997) em que aproximadamente 50% dos oligossacarídeos pertencem ao grupo XXXG. As subunidades restantes pertencem a uma nova classe baseada na estrutura XXXXG. Quanto as xiloglucanas fucosiladas, estas apresentam composição estrutural poli-XXXG (YORK et al., 1990; RENARD, LOMAX e BOOM, 1992; KONISHI, MITSUISHI e KATO, 1998; HUISMAN et al., 2000).

Diferentemente, as espécies Solanáceas apresentam 2 unidades de glucose substituídas alternadas com duas unidades não substituídas, sendo por isto denominadas de poli-XXGG. Pode-se citar como exemplos deste grupo as xiloglucanas do tabaco, do tomate (SIMS et al., 1996; YORK et al., 1996) e da batata (VINCKEN et al., 1996), sendo que estas xiloglucanas apresentam unidades de xilose substituídas por arabinose ou galactose.

Xiloglucanas fucosiladas foram isoladas a partir dos polissacarídeos extracelulares produzidos por cultura de células em suspensão de *Acer pseudoplatanus* (YORK et al., 1988) e do híbrido de *Mentha* (*M. arvensis* x *M. spicata*) (MARUYAMA et al., 1996). Estas apresentavam grupos O-acetil, os quais são raramente observados devido as fortes condições alcalinas necessárias para solubilizar as xiloglucanas das paredes celulares.

A xiloglucana fucosilada de bulbo de alho (*Allium cepa*), uma monocotilêdonea, apresenta composição e características estruturais semelhantes as encontradas em diversas espécies de plantas dicotiledôneas (REDGWELL e SELVENDRAN, 1986). Na parede celular do parênquima de *Phaseolus coccineus* também foram isoladas xiloglucanas fucosiladas (O'NEILL e SELVENDRAN, 1983; 1985).

Redgwell et al. (2003) analisaram os polissacarídeos da casca de *Theobroma cocoa* e identificaram ~ 20% de fucogalactoxiloglucanas. Toneladas destas cascas, possíveis fontes de fibra dietética, são descartadas todos os anos como resíduo do processamento industrial da semente do cacão, razão para pesquisas em torno do aproveitamento deste subproduto.

Xiloglucanas fucosiladas estão presentes também na parede celular de frutos. Este polissacarídeo foi isolado da polpa de maçã despectinizada (RENARD, LEMEUNIER e THIBAUT, 1995) e sem extração prévia de pectinas (WATT et al., 1999). Reid et al. (1999)

caracterizaram a xiloglucana secretada de cultura de células em suspensão de maçã, sendo o polissacarídeo similar ao extraído da polpa do fruto.

Doco et al. (2003) analisaram os polissacarídeos de parede celular primária do mesocarpo e exocarpo de uva, pois estes polímeros têm uma grande influência na integridade, textura e processamento do fruto, além de formarem uma barreira para a difusão de polifénóis e aromas que são importantes para a qualidade do vinho. Tanto na polpa quanto na casca foram identificadas xiloglucanas fucosiladas com composição monossacarídica semelhante.

O amadurecimento associado a alterações na parede celular tem sido estudado para muitos frutos principalmente com relação a mudanças de textura. Alterações nas pectinas são as mais comuns e envolvem o aumento de solubilidade, despolimerização, desesterificação e perda de açúcares neutros presentes nas cadeias laterais (VIERHIUS et al., 2000). A diminuição da massa molecular de hemiceluloses também foi descrita, sendo que as xiloglucanas parecem desempenhar um papel crucial no processo de amolecimento que acompanha o amadurecimento dos frutos.

A degradação de xiloglucanas foi descrita durante o amadurecimento de diversos frutos, como *Actinidia deliciosa* (kiwi) (REDGWELL, MELTON, BRASCH, 1991), *Lycopersicon esculentum* (tomate) (SAKURAI e NEVINS, 1993), *Diospyros kaki* (caqui) (CUTILLAS-ITURRALDE et al., 1998), *Cucumis melo* (melão) (ROSE et al., 1998), *Prunus persica* (pêssego) (HEGDE e MANESS, 1998) e *Musa sapientum* (maçã) (PRABHA e BHAGYALAKSHMI, 1998). Já em frutos de *Olea europea* (oliva) não foi observada nenhuma alteração na massa molecular das xiloglucanas durante o amadurecimento (VIERHIUS et al., 2000).

Alguns trabalhos descrevem a obtenção de xiloglucanas fucosiladas a partir de folhas de diferentes espécies. Em folhas imaturas de repolho (*Brassica oleracea*), a xiloglucana é o principal polissacarídeo hemicelulósico (STEVENS e SELVENDRAN, 1984). Em paredes celulares da epiderme, mesófilo e fibras de folhas de *Lolium perenne* e *Lolium multiflorum* foi identificada a presença de xiloglucanas, através de análises de metilação (CHESSON, GORDON, LOMAX, 1985).

Em cultura de células de folhas e caule de *Echinacea purpurea* foram isoladas xiloglucanas fucosiladas com atividade imunológica, capazes de estimular o sistema fagocitário humano (WAGNER et al., 1988). Mabusela, Stephen e Botha (1990) isolaram das folhas de *Aloe ferox*, entre outros polissacarídeos, uma xiloglucana.

Em estudo sobre as modificações nos polissacarídeos de parede celular, durante

crescimento de folhas de *Phaseolus vulgaris*, foi observado que as hemiceluloses solúveis em água, extraídas com KOH 24% aquoso, apresentaram as maiores mudanças, ocorrendo uma importante despolimerização da xiloglucana (ARRIBAS et al., 1991). A fucogalactoxiloglucana obtida de parede celular de folhas de algodão (*Gossypium* sp.) foi caracterizada, sendo a proporção de Glc: Xyl: Gal: Fuc de 1,4: 1: 0,4: 0,2 (BUCHALA et al., 1993). A xiloglucana de folhas de *Arabidopsis thaliana*, corresponde a 20% da parede celular, como nas dicotiledôneas típicas (ZABACKIS et al., 1995).

1.2. Interação xiloglucana e microfibrilas de celulose

Nas paredes celulares do tipo I as xiloglucanas estão localizadas ao redor e entre as microfibrilas de celulose, formando um complexo macromolecular (HAYASHI et al., 1987; BABA et al., 1994). Em estudos do efeito do grau de polimerização (DP) de oligossacarídeos de xiloglucanas de *Tamarindus indica* sobre a ligação com as microfibrilas de celulose, foi observado que a ligação ocorre com oligossacarídeos com DP maior do que quatro. A extensão da ligação à celulose aumentou gradualmente, do oligossacarídeo GXXGol até o XXXGXXXGol, com o aumento do DP dos oligossacarídeos (HAYASHI et al., 1994a). Hayashi et al. (1994b) analisaram a constante de adsorção à celulose de xiloglucanas fucosiladas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) e xiloglucanas não fucosiladas de *Tamarindus*, com o mesmo número de unidades de β -(1 $\rightarrow$ 4) glucose, e observaram que as unidades de fucose contribuem para o aumento da afinidade de adsorção.

Mishima et al. (1998) observaram que xiloglucana de tamarindo, β -D-glucana de *Hordeum vulgare* (cevada) e quitosana ligam-se à celulose por um mecanismo baseado na interação das superfícies das cadeias principais de β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucana as microfibrilas de celulose. Levy et al. (1991) concluíram, por modelagem molecular, que as xiloglucanas fucosiladas adotam uma conformação espacial mais favorável à ligação com a celulose do que as xiloglucanas não fucosiladas.

Tominaga et al. (1999) identificaram pela primeira vez a presença de celobiose, celotriose e celotetraose, em soluções apoplásticas de haste de ervilha tratadas com ácido indol-3-butírico, nos estágios iniciais de alongamento, sugerindo que a renovação induzida por auxina da xiloglucana é acompanhada pela renovação de celulose.

Thompson e Fry (2000) apresentaram evidências de que ~ 2/3 da xiloglucana de parede de cultura de células de rosa está ligada por pontes de hidrogênio a microfibrilas de celulose, e livres da rede de pectina, conforme proposto por Carpita e Gibeaut (1993). Mas ~ 1/3 da xiloglucana está covalentemente ligada a pectinas, como proposto por Keegstra et al. (1973).

Davis, Harris e Newman (2002) observaram a interação entre polissacarídeos não-celulósicos, provavelmente xiloglucana e galactomanana, e as microfibrilas de celulose, após extração com baixa concentração de álcali em folhas de *Arabidopsis thaliana* através de espectroscopia de ^{13}C -RMN no estado sólido. Após tratamento com álcali aquoso concentrado (KOH 4 mol/L), a temperatura ambiente, esta interação praticamente desapareceu, provavelmente devido à remoção das hemiceluloses pela extração alcalina.

1.3. Xiloglucanas no processo de expansão celular

A expansão da parede celular requer a integração entre o afrouxamento local da parede e o controle da deposição de novos componentes. A rede formada pelas cadeias de xiloglucana e microfibrilas de celulose fornece um equilíbrio entre extensibilidade e força necessária para a parede celular primária, que não pode ser alcançado com a celulose sozinha (WHITNEY et al., 1999).

A regulação endógena da expansão das células vegetais parece ser determinada por mecanismos específicos na parede celular. Este processo é resultado da interação entre pressão de turgor interna e a resistência mecânica da parede (SHPIGEL et al., 1998). O crescimento das células vegetais envolve muitos eventos enzimáticos, incluindo a quebra de fragmentos e possivelmente a clivagem enzimática de ligações entre os polímeros da parede celular, resultando no afrouxamento da mesma. Em oposição a este afrouxamento, ocorre a reconecção dos fragmentos cortados, e a síntese e inserção de novos polímeros na parede celular fortalecendo a matriz (PROSEUS, ORTEGA, BOYER, 1999).

Apesar das bases moleculares para estas modificações na parede serem em grande parte desconhecidas, já se sabe que elas envolvem proteínas capazes de modificar os constituintes da parede. Muitas proteínas com este potencial na parede celular foram caracterizadas, incluindo as pectinases, expansinas e xiloglucana endotransglicosilase (XET)

(CAMPBELL e BRAAM, 1999). Na Figura 5 pode-se observar uma representação esquemática da separação das microfibrilas de celulose guiada pela pressão osmótica. Este processo é facilitado pelo afrouxamento das ligações cruzadas entre os polissacarídeos. Isto deve ser acompanhado pela ação coordenada das expansinas que rompem as ligações entre as xiloglucanas e a celulose, e a XET, que hidrolisa a xiloglucana e religa uma parte da cadeia ao terminal não-redutor de outra cadeia (CARPITA e McCANN, 2000).

Smith e Fry (1991) evidenciaram pela primeira vez que as xiloglucanas estão sujeitas *in vivo* a clivagem seguida de transferência do fragmento cortado para outra molécula de xiloglucana. Nishitani e Tominaga (1991) sugeriram a possibilidade de transglicosilação de fragmentos observando as alterações de massa molecular de xiloglucanas de parede celular de *Vigna angularis*, quando tratadas com preparação de enzimas apoplásticas ou de parede celular. Fry et al. (1992) e Nishitani e Tominaga (1992) isolaram a enzima responsável pela transferência intermicrofibrilar de segmentos de xiloglucana para uma outra molécula de xiloglucana, sugerindo-se ser uma enzima de afrouxamento da parede, sendo denominada de xiloglucana endo-transglicosilase (XET). Os oligossacarídeos devem ter duas unidades de α -D-xilose para atuarem como substratos para a XET. O heptassacarídeo XXXG (Xyl_3Glc_4) é mais efetivo que o pentassacarídeo XXG (Xyl_2Glc_3). O terminal não redutor de xiloglucana de alta massa molecular pode também agir como um substrato (LORENCES e FRY, 1993). Antosiewicz et al. (1997) verificaram que a enzima XET está acumulada nas células em expansão, nos sítios de formação do espaço intercelular e nas bases de folhas, cotilédones e hipocótilos de *Arabidopsis*. As XETs também se acumulam no tecido vascular, onde modificações da parede celular levam a formação dos elementos traqueais. Thompson, Smith e Fry (1997) demonstraram a transglicosilação interpolimérica *in vivo* de fragmentos de xiloglucana em cultura de células de *Rosa sp.*

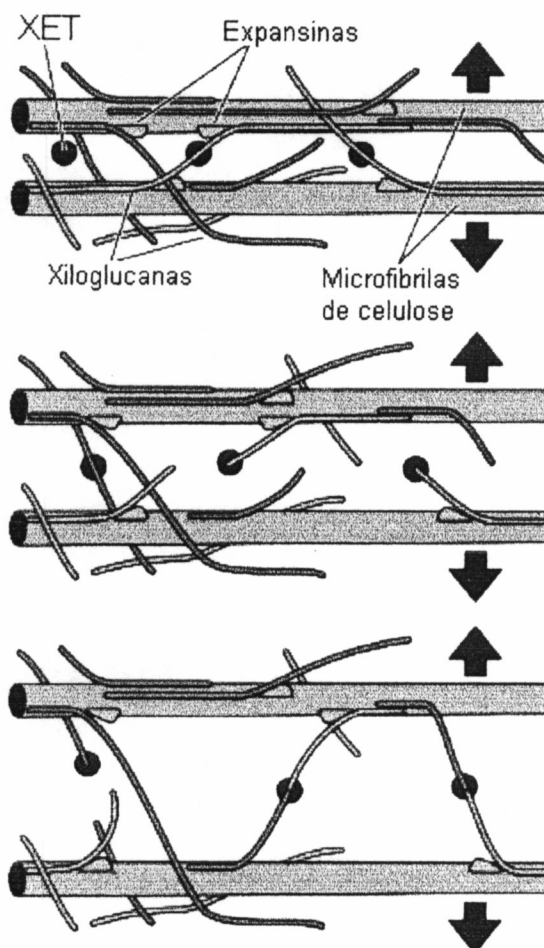


Figura 5. A separação das microfibrilas guiada pela pressão osmótica nas células (CARPITA e McCANN, 2000).

A XET está relacionada com vários aspectos fisiológicos do crescimento das plantas, como germinação das sementes (FARKAS et al., 1992), expansão celular (NISHITANI, 1995; TAKEDA et al., 1996); embriogênese somática (HETHERINGTON e FRY, 1993) e amadurecimento de frutos (REDGWELL e FRY, 1993; CUTILLAS-ITURRALDE et al., 1994; FAIK, DESVEAUX e MacLACHLAN, 1998). Vincken et al. (1997) observaram que a atividade da XET acelera a desintegração do tecido da maçã, no processo de liquefação durante a produção do suco de maçã. Além disso, Barrachina e Lorences (1998) determinaram pela primeira vez a atividade da enzima XET em gimnospermas, utilizando-se hipocótilos de *Pinus pinaster*.

Durante a reação com a xiloglucana, a XET forma um intermediário glicosil-enzima com o terminal redutor formado pela clivagem do polissacarídeo. O complexo intermediário xiloglucana-XET é relativamente estável e ligado covalentemente, podendo ser decomposto

pela transferência do glicosil para a água (hidrólise) ou, preferencialmente, para outra molécula de xiloglucana ou oligossacarídeo derivado desta (transglicosilação) (SULOVA et al., 1998). A formação reversível deste complexo enzima-substrato foi utilizada para purificação da XET de extrato de plantas (STEELE e FRY, 1999). Sulová, Baran e Farkas (2001) sugeriram que ~ 15% de XET estaria firmemente, provavelmente covalentemente ligada a parede celular das plantas. Foi observada a liberação destes complexos transitórios glicosil-enzima, durante a incubação com oligossacarídeos derivados de xiloglucana e a incorporação simultânea do oligossacarídeo XLLG marcado radioativamente.

Steele et al. (2001) testaram dez isoenzimas da XET e observaram que todas clivavam ligações glicosídicas específicas da xiloglucana, entre uma unidade de glucose substituída seguida de uma não substituída. Além disso, foi observado que tratamento com brassinosteróides, os quais atuam como reguladores endógenos do crescimento das plantas, regulam a atividade da XET, catalisando a endotransglicosilação (CLOUSE, 1997; KOKA et al., 2000).

Tiné, Cortelazzo e Buckeridge (2000) propuseram um modelo para a degradação “in vivo” das xiloglucanas de reserva, em que o polissacarídeo é primeiramente hidrolisado pela XET, caracterizando o período de transglicosilação. Somente após a hidrólise de certas unidades de galactose dos oligossacarídeos XLXG e XLLG (desgalactosilação), os oligossacarídeos remanescentes XXLG e XXXG, entram no ciclo final de degradação em que a glucose e a xilose são atacadas por β -glucosidase e α -xilosidase para produzir os monossacarídeos.

Posteriormente, Tiné, Lima e Buckeridge (2003) observaram que as unidades de galactose, em xiloglucanas de reserva, modulam a ação da celulase: a presença de β -galactosidase no sistema evita o acúmulo de dímeros dos oligossacarídeos. Porções menos ramificadas do polissacarídeo são preferenciais para o ataque da enzima, polímeros com diferenças na estrutura fina apresentam taxas de hidrólise diferentes com a mesma enzima. Além disso, as unidades de galactose parecem influenciar a interação entre as xiloglucanas e a celulose (LIMA e BUCKERIDGE, 2001). No entanto, não ficou completamente esclarecido que fator relacionado à estrutura fina pode realmente afetar a capacidade de ligação, o grau de galactosilação ou a distribuição das unidades de galactose.

Sulová, Baran e Farkas (2003) identificaram duas isoenzimas para a XET em *Tropaeolum majus*. Uma está localizada nas sementes, é expressa durante a germinação, tem preferência por oligossacarídeos de xiloglucana com menor massa molecular, clivando o

polissacarídeo em diferentes pontos ao longo da cadeia principal. A outra está confinada nos epicótilos e outras zonas de crescimento, ataca o substrato, preferencialmente próximo à extremidade redutora e não apresenta preferência pelo tamanho dos oligossacarídeos. Estas propriedades estão de acordo com as funções das duas isoenzimas: degradação da xiloglucana de reserva nas sementes durante a germinação e rearranjo da parede celular e integração de novas moléculas de xiloglucana na parede celular pré-existente durante o crescimento.

Um outro tipo de proteína de afrouxamento da parede celular, a expansina, foi isolada por McQueen-Mason, Durachko e Cosgrove (1992). Uma propriedade das células em crescimento é sua habilidade de extensão em pH ácido. As expansinas apresentam um pH ótimo ácido para a indução da expansão da parede celular, o que reforça hipótese do seu papel na catálise do crescimento induzido ácido. As expansinas estão fortemente ligadas a parede celular, aparentemente em regiões não cristalinas das microfibrilas de celulose (COSGROVE, 1998). Estas proteínas, provavelmente interagem também com polissacarídeos não-celulósicos e facilitam a expansão celular por romper ligações não-covalentes entre ambos. Assim, as expansinas facilitam o deslizamento entre as microfibrilas e os outros componentes da parede, o qual é dirigido pela pressão de turgor (McQUEEN-MASON e COSGROVE, 1995; SCHINDLER, 1998).

Pouca atenção tem sido dada a possibilidade dos polissacarídeos de parede sofrerem cisão não-enzimática durante o processo de expansão. Miller e Fry (2001) submeteram xiloglucana de sementes de tamarindo a degradação parcial “in vitro”, ao ataque por radicais $\bullet\text{OH}$, fornecendo uma estratégia de pesquisa para evidenciar futuramente se a ação de radicais livres endógenos é um mecanismo fisiológico significativo para o afrouxamento da parede celular.

Farkas, Hanna, McLachlan (1991) identificaram a atividade da enzima α -L-fucosidase em segmentos de caule de *Pisum sativum* (ervilha) em crescimento e em sementes de *Tropaeolum majus* (capuchinha), utilizando o nonassacarídeo fucosilado XXFG como substrato. Esta enzima pode ser um importante fator na regulação do crescimento das plantas, pois inativa os oligossacarídeos contendo fucose, os quais apresentam efeitos biológicos marcantes neste processo (AUGUR et al., 1995). Vargas-Rechia et al. (1998) verificaram que o oligossacarídeo XXLGol tem a habilidade de induzir, em concentrações nanomolares, um aumento rápido da resposta da α -L-fucosidase em protoplastos ou células em suspensão de *Rubus fruticosus*.

Reiter, Chapple e Somerville (1993) verificaram que plantas mutantes de *Arabidopsis*

Reiter, Chapple e Somerville (1993) verificaram que plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana mur1*, completamente deficientes em L-fucose, devido à deficiência na sua síntese, cresceram menos que o tipo selvagem e suas paredes celulares foram consideradas mais frágeis do que o normal.

A fucosiltransferase transfere unidades de fucose terminais para as cadeias laterais das xiloglucanas recém-sintetizadas no complexo de Golgi e vesículas secretórias, estando a enzima relacionada a biossíntese da parede celular (CAMIRAND, BRUMMELL e McLACHLAN, 1987; McLACHLAN et al., 1992; ZHANG e STAEHELIN, 1992; MISAWA et al., 1996; FAIK et al., 1997). O gene que codifica a xiloglucana fucosiltransferase em *Arabidopsis* (AtFUT1) foi clonado (PERRIN et al., 1999), sendo membro de uma família de multi-genes que apresenta dez membros (REITER, 2002).

Vanzin et al. (2002) verificaram que a mutante *mur2* não apresentava xiloglucana fucosilada devido a um ponto de mutação em AtFUT1, responsável por toda a atividade de xiloglucana fucosiltransferase em *Arabidopsis*. No entanto as plantas *mur2* apresentaram parede celular e crescimento normais, sugerindo que o fenótipo de *mur1* seja devido a mudanças estruturais em pectinas fucosiladas, tais como ramnogalacturonanas II (RG-II).

Apesar da bioquímica e da biologia molecular da fucosilação da xiloglucana estar razoavelmente compreendida, a complexidade da síntese da cadeia de β -glucana e a substituição por xilose e esta por galactose ainda precisam ser esclarecidas (REITER, 2002). A xiloglucana da espécie mutante de *Arabidopsis mur3* não apresenta a cadeia lateral α -L-fucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactopiranosose, mas apresenta excessiva galactosilação, que ocorre especificamente nas unidades de xilose na posição **b**, sendo constituída somente pelos oligossacarídeos XXXG e XLXG. Apesar desta alteração estrutural severa, as plantas são fenotipicamente normais e apresentam resistência a tensão em seus caules semelhantes as plantas selvagens (LEROUXEL et al, 2002). O gene MUR3 foi clonado e verificou-se que este codifica uma galactosiltransferase específica para a posição **b**. Esta enzima é homóloga ao domínio glucuronosiltransferase das exostosinas, uma classe de glicosiltransferases de origem animal, que catalisam a síntese de heparana-sulfato, uma glicosaminoglicana envolvida na adesão celular e nas vias de comunicação intercelular. Estes resultados sugerem que os componentes das paredes celulares das plantas e a matriz extracelular dos animais são sintetizados por enzimas evolutivamente relacionadas, apesar das estruturas dos polissacarídeos correspondentes serem completamente diferentes (MADSON et al., 2003).

1.4. Oligossacarídeos livres relacionados às xiloglucanas

Alguns oligossacarídeos agem como moléculas regulatórias, sendo chamados de oligossacarinas. Plantas, como outros organismos apresentam sistemas sinalizadores que regulam a expressão de genes essenciais para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência em seu meio ambiente. A expressão de alguns destes genes é regulada por oligossacarídeos (DARVILL et al., 1992).

Algumas oligossacarinas são elicitores, isto é induzem respostas que ajudam a planta a resistir a doenças. Outras, entretanto, tem efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas (FRY et al., 1993). Os oligossacarídeos livres relacionados às xiloglucanas são considerados como oligossacarinas, pois regulam o crescimento celular induzido por auxina, a morfogênese e a indução de inibidores das proteinases (DARVILL et al., 1992). A atividade biológica dos oligossacarídeos derivados de xiloglucanas pode estar relacionada com o número e tipo de unidades monossacarídicas que compõem o oligossacarídeo (McDOUGALL e FRY, 1990; VARGAS-RECHIA et al., 1998).

Estes oligossacarídeos de xiloglucana podem ser obtidos “in vitro” por ação de celulasas obtidas de fungos. Estas enzimas hidrolisam seletivamente ligações β -(1→4) da cadeia principal do polissacarídeo, depois de uma unidade de glucose não substituída. WATT et al. (2000) realizaram a síntese química do trissacarídeo α -L-Fucp(1→2)- β -D-Galp-(1→2)- α -D-Me-Xylp.

Para facilitar a identificação da posição dos monossacarídeos dentro do oligossacarídeo, York et al. (1990) utilizaram os índices **a**, **b** ou **c** para as unidades de glucose dependendo da proximidade com a unidade redutora. A posição dos monossacarídeos nas cadeias laterais são indicadas pelo índice da unidade de glucose a qual a cadeia lateral está ligada, como pode ser observado Figura 6.

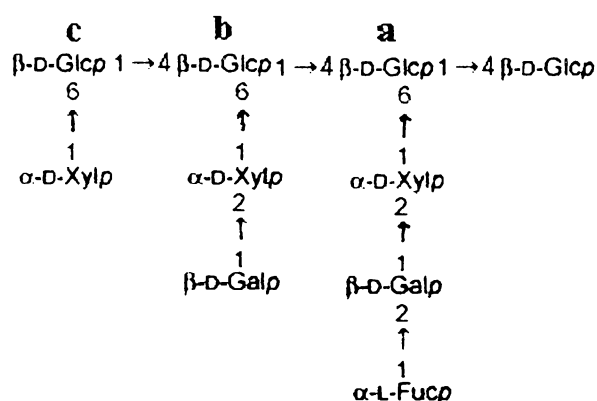


Figura 6. Estrutura do oligossacarídeo XLFG (YORK et al., 1990)

Os oligossacarídeos XXXG, XXLG, XLXG e XLLG obtidos a partir da xiloglucana das sementes de tamarindo foram extensivamente estudados. O grupo de Albersheim caracterizou estruturalmente estes oligossacarídeos por $^1\text{H-RMN}$ e FAB-MS (YORK et al., 1990) e posteriormente, por digestão com β -galactosidase obtida de *Aspergillus niger*, verificou que esta enzima hidrolisava seletivamente a galactose de um dos dois octassacarídeos isômeros (XXLG e XLXG) (YORK et al., 1993). Estes oligossacarídeos também foram caracterizados por MALDI-TOF MS (YAMAGAKI, MITSUISHI e NAKANISHI, 1997; YAMAGAKI, MITSUISHI e NAKANISHI, 1998). Mais recentemente, foram analisados por uma série de métodos cromatográficos (GC, GC-MS, HPAEC-PAD, MALDI-TOF MS) com objetivo de serem utilizados futuramente como padrões para investigar a atividade de enzimas envolvidas na sua biossíntese (MARRY et al., 2003).

Watanabe, Takahashi e Matsuda (1980) trataram a xiloglucana de sementes de jojoba com celulase de *Trichoderma viride* e identificaram os oligossacarídeos usuais de xiloglucana de reserva. Posteriormente, Hantus et al. (1997) identificaram nesta mesma xiloglucana, uma nova cadeia lateral, contendo L-Gal e D-Gal, designada pela letra J [$\alpha\text{-L-Galp}(1\rightarrow2)\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow2)\alpha\text{-D-Xylp}(1\rightarrow6)\text{-}$], presente nos oligossacarídeos XXJG e XLJG. Braccini et al. (1995) identificaram os oligossacarídeos XXXG, XLLG e XXGG na xiloglucana de sementes de ciclame tratada com a mesma celulase.

Na xiloglucana isolada de cultura de *Nicotiana tabacum* foram identificados, como principais oligossacarídeos, o XXGG e XSGG e na xiloglucana produzida por cultura de células de *Lycopersicon esculentum*, além destes dois oligossacarídeos, foram caracterizados o LSGG e XTGG (YORK et al., 1996). Mais recentemente, Jia et al. (2003) purificaram e

caracterizaram, nesta mesma espécie, pequenas quantidades de oligossacarídeos constituídos por uma cadeia principal de celotriose ou celo-heptaose, tais como XGGol e XGGXSGGol.

A xiloglucana obtida do fruto de *Olea europea* é constituída por blocos construtivos do tipo XXXG, com unidades de galactose e/ou arabinose ligadas (VIERHIUS et al., 2001a). No entanto, cadeias laterais contendo arabinose foram descritas como características para as xiloglucanas isoladas das Solanáceas, que apresentam blocos construtivos do tipo XXGG (VINCKEN et al., 1997). Nesta xiloglucana foram identificados dois novos oligossacarídeos XXSG e XLSG através de análise de RMN e MALDI-TOF (VIERHIUS et al., 2001b).

Os oligossacarídeos obtidos a partir de xiloglucanas fucosiladas foram isolados a partir das mais diversas fontes. Um dos primeiros trabalhos foi realizado por Bauer et al. (1973), utilizando análise de metilação dos oligossacarídeos obtidos por tratamento com endoglucanase da xiloglucana de parede celular e secretada a partir de cultura de células de *Acer pseudoplatanus*. Neste trabalho foram identificados os oligossacarídeos que posteriormente (FRY et al., 1993) seriam denominados de XXG, XXXG e XXFG, além de uma pequena proporção de oligossacarídeos contendo arabinose. York et al. (1990) caracterizaram a estrutura destes oligossacarídeos por ¹H-RMN e FAB-MS. Hisamatsu et al. (1991) identificaram um novo oligossacarídeo com duas unidades de fucose, denominado de undecassacarídeo (que corresponderia ao XFFG). York et al. (1995) caracterizaram vários oligossacarídeos com DP entre 17 e 20, obtidos por hidrólise enzimática da xiloglucana secretada pela cultura de células.

Xiloglucanas presentes na parede celular da maçã são formadas pela repetição dos oligossacarídeos XXXG, XXFG e XLFG (RENARD, LOMAX e BOON, 1992). Ao contrário da situação geralmente encontrada, em que os oligossacarídeos XXXG e XXFG são preponderantes (YORK et al., 1990), nesta xiloglucana os três oligossacarídeos estão em proporções praticamente idênticas. Vincken et al. (1996) observaram que durante a hidrólise *in vitro* de xiloglucana de maçã com endoglucanase, fragmentos como XXXGXXFG são mais facilmente hidrolisáveis, do que XLFGXXXG ou XXFGXXXG. Levy et al. (1991) observaram por modelagem molecular que a xiloglucana apresenta uma conformação “twisted” e a cadeia lateral de trissacarídeo dobra-se em direção a cadeia principal. Isto explicaria o acesso mais difícil da enzima nos fragmentos citados anteriormente. A ligação do fragmento XLFGXLFG seria a menos específica para a enzima indicando que possivelmente as unidades de galactose também interfeririam na ação da enzima (VINCKEN et al., 1996).

Além destes oligossacarídeos, Spronk et al. (1998) identificaram na xiloglucana de maçã, o hexassacarídeo GFG e o dodecassacarídeo GFGGFG, este último sendo um elemento estrutural incomum. O espectro de ^{13}C -RMN dos oligossacarídeos XXFG e XLFG obtidos por Watt et al. (1999) confirmaram a hipótese de que as unidades de fucose na xiloglucana intacta estão próximas no espaço da cadeia principal de glucose (LEVY et al., 1991).

Na xiloglucana de sementes de soja foram identificados oligossacarídeos fucosilados. Os principais oligossacarídeos obtidos foram o XXLG, XXXG e XXFG (HAYASHI, KATO e MATSUDA, 1980), além destes foram identificados posteriormente pequenas proporções dos oligossacarídeos XLXG, XLLG e XLFG, através de HPAEC-PAD e MALDI-TOF MS (KONISHI et al., 1998; HUISMAN et al., 2000). Na xiloglucana de *Vigna radiata*, através dos mesmos métodos, foram encontrados pequenas proporções de XXLG, XLXG e XLLG (KONISHI, MITSUISHI e KATO, 1998; YAMAGAKI, MITSUISHI e NAKANISHI, 1998), além dos principais oligossacarídeos anteriormente caracterizados XXXG, XXFG e XLFG (KATO e MATSUDA, 1980).

Desveaux, Faik e MacLachlan (1998) verificaram que frutos jovens de *Tropaeolum majus* depositam dois tipos de xiloglucanas durante o seu desenvolvimento até a maturação: uma xiloglucana de reserva, especificamente no espaço periplasmático das células do cotilédone, e uma xiloglucana estrutural, na parede celular primária em crescimento. A xiloglucana estrutural é fucosilada, sendo constituída pelos oligossacarídeos XLFG, XXFG, XXXG, XXLG e XLXG.

KAKEGAWA, EDASHIGE e ISHI (1998) isolaram, das zonas de diferenciação do xilema de *Cryptomeria japonica*, uma xiloglucana consistindo de cinco tipos de oligossacarídeos, XXXG, XXLG, XXFG, XLLG e XLFG, os quais são comumente encontrados em plantas dicotiledôneas.

Os oligossacarídeos obtidos de três mutantes e do tipo selvagem de mudas de *Arabidopsis* foram analisados por MALDI-TOF MS e HPAE-PAD. O tipo selvagem apresenta os oligossacarídeos característicos de parede celular primária. Nos mutantes foi observado a diminuição (*mur 1-1*) dos oligossacarídeos fucosilados ou a ausência (*mur-2*) dos mesmos, devido a inativação da fucosiltransferase. Em *mur3* foram identificados somente os oligossacarídeos XXXG e XLXG, indicando que a mutação também afetou a galactosiltransferase envolvida na transferência de unidades de galactose na posição a (LEROUXEL et al, 2002). Além disso, *mur1-1* apresenta o decassacarídeo XLJG (ZABLACKIS et al.; 1996; LEROUXEL et al, 2002).

Doco et al. (2003) analisaram os oligossacarídeos obtidos por tratamento do mesocarpo e exocarpo de *Vitis vinifera* com endoglucanase xiloglucana-específica de *Aspergillus oryzae*. XXXG, XXFG e XLFG foram quantitativamente os principais oligossacarídeos na xiloglucana da casca e da polpa.

Com relação à atividade biológica destes oligossacarídeos, York, Darvill e Albersheim (1984) observaram que o nonassacarídeo fucosilado XXFG, gerado pelo tratamento de xiloglucana de *Acer pseudoplatanus* com celulase fúngica, inibia o crescimento induzido por ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em segmentos de caule de ervilha. McDougall e Fry (1988) encontraram os mesmos resultados utilizando o nonassacarídeo fucosilado XXFG isolado de xiloglucana de cultura de células em suspensão de *Rosa sp.* O nonassacarídeo fucosilado XXFG, inibe o crescimento celular, ou seja, apresenta atividade anti-auxínica, a qual ocorre devido a presença da unidade α -L-fucopiranosil na cadeia lateral da xiloglucana ligada em O-2 da unidade de β -D-galactopiranosose, sendo a atividade ótima anti-auxínica a 10^{-9} mol/L de XXFG. O undecassacarídeo XFFG, o qual contém duas cadeias laterais com galactose-fucose, é mais efetivo do que o nonassacarídeo na inibição do crescimento estimulado por 2,4-D (DARVILL et al., 1992). Já o nonassacarídeo não fucosilado XLLG comporta-se aparentemente como um ativador do crescimento celular (McDOUGALL e FRY, 1990).

Vários oligossacarídeos contendo fucose foram testados quanto a sua habilidade em mimetizar o efeito anti-auxínico do XXFG. O pentassacarídeo contendo fucose (FG) e o trissacarídeo do leite humano [L-Fucp- α -(1 $\rightarrow$ 2)-D-Galp- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc], cuja ligação fucose-galactose é idêntica a do oligossacarídeo XXFG, na concentração de 10^{-8} mol/L, foram tão efetivos quanto o XXFG a 10^{-9} mol/L. A L-fucose livre e metil α -L-fucopiranosídeo não foram capazes de inibir o crescimento induzido por auxina (McDOUGALL e FRY, 1989).

O crescimento de segmentos de epicótilo de *Vigna angularis* induzido por auxina, é suprimido por lectinas de ligação a fucose de *Tetragonolobus purpureus* e *Ulex europeus* e por anticorpos policlonais contra o heptassacarídeo (XXXG). Estas lectinas também inibem o afrouxamento da parede celular dos segmentos e as alterações da massa molecular da xiloglucana induzidas por auxina (HOSON e MASUDA, 1991; HOSON et al., 1993).

Estes oligossacarídeos com atividade anti-auxínica apresentam condições estruturais relativamente restritas, como a necessidade da cadeia lateral L-Fucp- α -(1 $\rightarrow$ 2)-D-Galp, indicando a presença de receptores específicos para estas oligossacarinas nas células das

plantas (ALDINGTON, McDOUGALL, FRY, 1991).

A interação de um ligante com seu receptor, constituído por uma ou várias unidades de reconhecimento e uma ou várias unidades de transdução, desencadeia uma seqüência de eventos citoplasmáticos, genômicos ou na própria membrana celular, que conduzem a uma resposta fisiológica na célula (síntese *de novo*, ativação de proteínas pré-existentes, modificação do influxo de íons) (SHIBUYA e MINAMI, 2001).

Receptores específicos nas membranas plasmáticas das plantas para oligossacarídeos elicitores já foram identificados, tais como para fragmentos de polissacarídeos de parede celular de fungos e das próprias plantas (DARVILL et al., 1992; HAHN, 1996; SHIBUYA e MINAMI, 2001). Exemplos incluem os receptores para hepta- β -glucopiranosídeo da parede celular do fungo *Phytophthora megasperma*, os quais induzem a produção de fitoalexinas em soja (UMEMOTO et al., 1997); receptores para glicanas *N*-ligadas de fungos envolvendo o aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia liase (FAL) no tomate (FATH e BOLLER, 1996); e receptores para fragmentos de quitina, exemplo *N*-acetilquitooctaose responsável pela indução de respostas de defesa em tomate e arroz (BAUREITHEL, FELIX, BOLLER, 1994; SHIBUYA et al., 1993).

Quanto aos oligossacarídeos relacionados às xiloglucanas, Dunand et al. (2000) testaram a habilidade da cadeia lateral do nonassacarídeo XXFG (α -L-Fuc(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Gal (1 $\rightarrow$ em se ligar a proteínas solubilizadas da membrana plasmática isolada de protoplastos de *Rubus fruticosus* (amora). Para isto, foram utilizadas neoglicoproteínas constituídas pelo trissacarídeo 2'-fucosil-lactose conjugadas a biotina ou digoxigenina, sendo isolada uma fração que apresentou afinidade pelo oligossacarídeo.

1.5. *N*-glicanas fucosiladas

Oligossacarídeos fucosilados ocorrem também em células animais onde desempenham uma variedade de papéis biológicos, especialmente em processos de reconhecimento. Em mamíferos, a ênfase no estudo de oligossacarídeos está na sua importância médica, especialmente no processo inflamatório e no câncer (STAUDACHER et al., 1999). Unidades de L-fucose são freqüentemente encontradas nos terminais não redutores da parte carboidrato de glicoconjugados de superfície celular, estando relacionados à interação célula-célula; na

mucina gástrica e submaxilar; como determinantes antigênicos de grupo sanguíneo; em glicolipídios e glicoproteínas séricas (FLOWERS, 1981; SPRINGER e LASKY, 1991; SANO et al., 1992).

As *N*-glicanas, que correspondem a porção carboidrato de várias glicoproteínas, são oligossacarídeos, compostos por *N*-acetil- β -D-glucosamina, α -D-manose, β -D-galactose e α -L-fucose. Estão unidas a porção protéica da glicoproteína através de ligações *N*-glicosídicas ao nitrogênio da amida de resíduos de asparagina. Com relação às unidades de fucose, estas apresentam ligações α -(1 $\rightarrow$ 3) ou α -(1 $\rightarrow$ 4) com unidades de *N*-acetil-glucosamina e α -(1 $\rightarrow$ 2) com unidades de galactose terminais (STAUDACHER et al., 1999). Este último motivo estrutural, é idêntico ao dissacarídeo α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Gal, presente nas cadeias lateral das xiloglucanas de parede, sendo denominado de antígeno Lewis^Y (Le^Y) nas *N*-glicanas.

Processos de reconhecimento de carboidratos estão envolvidos em várias desordens inflamatórias agudas e crônicas tais como artrite reumatóide e inflamações de pele. Estes aspectos clínicos encorajam a pesquisa básica nesta área (STAUDACHER et al., 1999). Existem indícios de que carboidratos α -(1 $\rightarrow$ 3) fucosilados, e seus derivados contendo ésteres sulfatados e ácido siálico, atuam como ligantes para selectinas, tais como selectina-E e -P, expressas por células endoteliais ativadas por citocinas. As selectinas se ligam a carboidratos relacionados aos antígenos de grupo sanguíneo Lewis (α -L-Fuc(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Gal), expressos em monócitos, neutrófilos e algumas células-T. Este complexo receptor-ligante facilita o extravasamento dos leucócitos para o tecido lesado (SARKAR et al., 1997; LOWE, 1997).

Níveis elevados dos antígenos fucosilados ou sialil-fucosilados de cadeias de poligalactosaminas presentes nas glicoproteínas séricas, identificados por anticorpos monoclonais, são freqüentemente observados no soro de pacientes com tumores malignos. Os níveis destes mesmos antígenos são consideravelmente baixos em pacientes com tumores benignos e em indivíduos saudáveis. Além disso, foi observado que a concentração do antígeno Le^Y está freqüentemente elevada no soro de pacientes com hepatoma (KANNAGI et al., 1986).

As glicoproteínas nas células tumorais são em geral altamente ramificadas, e sua composição oligossacarídica é freqüentemente alterada quando comparada com células normais, sendo que o número e o tipo de ligações das unidades de fucose e ácido siálico são característicos para vários tumores (MAGNANI et al., 1983; SHI et al., 1984; KANNAGI et al., 1986). A L-fucose está ligada às cadeias de glicanas de marcadores tumorais. Em paralelo

com o aumento do número de glicanas fucosiladas, a expressão das fucosiltransferases correspondentes também está elevada (STAUDACHER et al., 1999).

Além de alterações na atividade das fucosiltransferases, Song et al. (1999) detectaram alterações na atividade da enzima α -L-fucosidase em pacientes com carcinoma hepático primário e em células cancerígenas de pulmão. Os valores de L-fucose na urina de pacientes com carcinoma hepatocelular, cirrose, hepatite crônica e aguda, carcinoma de pâncreas, câncer gástrico, pulmonar, intestinal, esofageano e ovariano são significativamente diferentes dos indivíduos normais. Detecção de L-fucose é um dos testes de marcadores tumorais para pacientes com tumor gastro-intestinal (GIARDINA et al., 1998; SONG et al., 1999).

Estruturas fucosiladas demonstraram estar envolvidas em vários eventos de reconhecimento celular. A elucidação das mudanças que ocorrem nos padrões de glicosilação durante processos patológicos levará a descoberta de estruturas não usuais agindo como drogas sítio específicas (STAUDACHER et al., 1999).

A importância das xiloglucanas fucosiladas, conforme descrito nesta introdução, motivou o presente trabalho.

1.6. *Hymenaea courbaril*

A xiloglucana estrutural investigada neste trabalho foi obtida de folhas de *Hymenaea courbaril*. A posição sistemática desta espécie segundo Cronquist (1988) está descrita abaixo:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Caesalpinaceae

Gênero: *Hymenaea*

Espécie: *H. courbaril*

Hymenaea courbaril é conhecida popularmente como jatobá, jataí, jitaí, farinha e jataíba. É uma espécie nativa, ocorrendo desde o Piauí até o norte do Paraná, na floresta semidecídua, tanto em solos de alta como de média fertilidade (cerradões) (LORENZI, 1992) (Figura 7). Apresenta altura de 15 a 20 metros, com tronco de até 1 metro de diâmetro, tortuoso e irregular. As folhas são pecioladas, de colocação alternada, cor verde escura, cujos folíolos em número de dois, são de forma oval e se dispõem um perto do outro. As flores são

pequenas em corimbos terminais paucifloros, pétalas brancas, pouco maiores do que o cálice; o fruto é uma vagem marrom avermelhado, medindo 8 a 15 centímetros de comprimento por 3 a 5 centímetros de largura. Apresenta consistência dura, de forma arredondada e outras vezes achatada, contendo 3-6 sementes, envoltas numa substância farinácea, compacta, adocicada e comestível. Floresce durante os meses de outubro-dezembro. Os frutos amadurecem a partir do mês de julho (RIZZINI, 1978; LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994).

O desenvolvimento da plântula é rápido sob as condições de casa de vegetação e fornece a possibilidade de se obter numerosas sementes, que podem ser usadas em programas de reflorestamento (FLORES e BENAVIDES, 1990). A madeira é usada na construção civil e na carpintaria em geral. Os frutos são comestíveis e utilizados na alimentação humana e animal (CARVALHO, 1994). O jatobá é uma planta muito importante na medicina popular, sendo as cascas, as raízes, a polpa do fruto e a resina excretada pelo tronco e ramos, utilizadas em infecções pulmonares. A resina avermelhada é conhecida por “jutaicica”, “resina animada”, “goma copal”, “copal da América” e “copal do Brasil”. Sua casca é adstringente e o chá das raízes diurético (RIZZINI, 1978; CARVALHO, 1994).

Artavia (1995) identificou nas folhas de *Hymenaea courbaril*, um flavonol ramnosídeo. Compostos diterpênicos do tipo labdane foram isolados como os maiores componentes da resina excretada pelo tronco (CUNNINGHAM, MARTIN, e LANGENHEIM, 1974), sendo também identificados nas folhas de *H. courbaril* (MARSAIOLI *et al.*, 1975). Stubblebine e Langenheim (1980) realizaram estudos comparativos da variabilidade na composição de compostos sesquiterpênicos da resina de folhas de várias espécies de *Hymenaea*, e os possíveis papéis ecológicos desta, nos diversos ecossistemas dos trópicos. Langenheim *et al.* (1982) estudaram as implicações evolutivas das vesículas de resina da folha de diversas espécies de *Hymenaea*, quanto ao volume e densidade da vesícula e rendimento e composição da resina (α - e β -selineno e cariofileno).

O grupo de Química de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná vem realizando diversos estudos referentes a xiloglucana presente nas sementes de *H. courbaril*. Lima *et al.* (1993; 1995) isolaram uma xiloglucana das sementes totais de *H. courbaril*, coletadas em Teodoro Sampaio (SP). O polissacarídeo apresentou 40 a 45% de rendimento, em relação ao pó das sementes moídas, sendo sua estrutura básica constituída por uma cadeia principal de β -D-glucana parcialmente substituída, ligada em O-6 com cadeias laterais de α -D-xilopirranose algumas das quais são substituídas em O-2 por β -D-galactopirranose.



Figura 7. *Hymenaea courbaril* (LORENZI, 1992).

Souza-Lima et al. (1996) estudaram a atividade anticoagulante das xiloglucanas de sementes de *Hymenaea courbaril*, coletadas em Ribeirão Preto (SP), e modificadas por sulfatação. Além disso, observou no extrato aquoso destas sementes, uma galactoxiloglucana como fração principal e a presença de galactomanana em menor proporção (Souza-Lima, 1997).

Vargas-Rechia et al. (1998) obtiveram do endosperma isolado das sementes de *Hymenaea courbaril* a xiloglucana purificada (relação Glc:Xyl:Gal de 4,5:3:1) com rendimento de ~85% em relação ao endosperma seco. Esta foi tratada com uma endo-(1→4)- β -D-glucanase e uma endoxiloglucanase, obtendo-se o XXLG e o XXXG, como os oligossacarídeos principais, sendo posteriormente reduzidos. A atividade auxínica do XXLGol, *in vivo*, foi analisada usando-se coleóptilos de trigo. O XXLGol promoveu o crescimento independente da presença de 2,4-D. Na presença de 2,4-D, XXLGol, em concentração nanomolar, aumentou a resposta induzida por auxina. Os oligossacarídeos de xiloglucana também apresentaram efeitos na indução de glico-hidrolases em células e/ou protoplastos de *Rubus fruticosus*, sendo a resposta mais significativa para a atividade da α -L-fucosidase. O XXLGol, em concentração nanomolar, causa um rápido aumento da resposta α -L-fucosidase e modula a resposta da α -L-fucosidase induzida por 2,4-D e ácido giberélico.

Freitas et al. (2003) verificaram, por análises reológicas, uma interação sinérgica positiva entre a xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*, coletada em Foz do Chopin (PR), quando em presença de amidos ricos em amilose. Xiloglucanas de sementes de *Hymenaea courbaril*, coletadas em diferentes regiões do Brasil, foram analisadas por HPSEC-MALLS, sendo observado nestas amostras a presença de agregados moleculares. Além disso, o polissacarídeo obtido de sementes coletadas em Foz do Chopin (PR), após oxidação seletiva, apresentou redução de M_w . A inserção de grupos ácidos na molécula gerou uma alteração da conformação, passando de ao acaso no polímero nativo, para estruturas em bastão nos modificados (Freitas, 2003).

Martin et al. (2003) observaram, também por análises reológicas, que duas amostras com diferentes M_w do polissacarídeo de reserva das sementes de *Hymenaea courbaril*, coletadas em Ribeirão Preto (SP), interagiram com íons tetraborato em solução aquosa. A viscosidade da mistura é maior para a xiloglucana com maior valor de M_w , embora em nenhum dos casos foi observado comportamento de gel.

Lima et al. (2003) avaliaram meios constituídos por misturas de ágar e xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*, coletadas em Sinope (MS), na proliferação de gemas axilares de macieiras cv. Jonagored (*Malus doméstica*) e porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh). A taxa de crescimento e a proliferação de brotos foram maiores no meio contendo a mistura do que no meio geleificado somente com ágar.

O grupo do Instituto de Botânica (SP) degradou a xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*, coletada em São Paulo (SP), com endoglucanase de *Trichoderma viride* e identificou que ~50% dos produtos são oligossacarídeos comuns (XXXG, XLXG, XXLG e XLLG). Os 50% restantes pertencem a uma nova classe baseada na estrutura XXXXG, compreendendo o próprio, mais este oligossacarídeo ligado a unidades de β -galactose (BUCKERIDGE et al., 1997).

Lima e Buckeridge (1997) analisando a interação entre celulose e xiloglucanas de reserva, observou que a xiloglucana de *H. courbaril* apresentou a maior capacidade de ligação (33,8%), do que a xiloglucana obtida de *Tamarindus indica* (30,9%), *Tropaeolum majus* (26,9%) e *Copaifera langsdorffii* (26,6%).

Tiné, Cortelazzo e Buckeridge (2000) estudaram o metabolismo da xiloglucana de *H. courbaril* durante e depois da germinação, com o objetivo de comparar o sistema de degradação com os de outras sementes contendo xiloglucanas. Analisando a degradação do polissacarídeo de sementes de *H. courbaril*, propuseram um modelo de degradação para as xiloglucanas de reserva nas leguminosas.

Xiloglucanas fucosiladas foram isoladas a partir das folhas despigmentadas, deslignificadas e despectinizadas de *Hymenaea courbaril*, coletadas em Ribeirão Preto (SP) (BUSATO, 1999). Estes polissacarídeos foram purificados por cromatografia de troca-iônica e analisados estruturalmente, sendo constituídos por uma cadeia principal formada por unidades de D-glucopirranose com ligação β -(1 $\rightarrow$ 4), sendo ~60% dessas unidades substituídas em O-6 por unidades de α -D-xilopirranose. Aproximadamente a metade das unidades de xilose são substituídas na posição O-2 por β -D-galactopirranose, esta última apresenta ainda unidades de L-fucose com ligações α -(1 $\rightarrow$ 2) à algumas unidades. Além disso, uma xilana ácida obtida das folhas de *H. courbaril* também foi analisada estruturalmente, sendo constituída por uma cadeia principal de unidades de D-xilose com ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), apresentando algumas destas unidades substituições em O-2 por unidades de ácido α -glucurônico e/ou seu derivado 4-O-metil (BUSATO, VARGAS-RECHIA e REICHER, 2000).

II. JUSTIFICATIVA

Conforme já relatado, as xiloglucanas, principais polissacarídeos da parede celular primária de todas as dicotiledôneas, estão envolvidas no processo de expansão celular, tanto devido ao seu papel estrutural na parede quanto à função sinalizadora de seus oligossacarídeos. A importância da xiloglucana na parede celular, bem como a ação biológica de seus oligossacarídeos motivou o presente trabalho.

As análises da xiloglucana per-*O*-metilada, bem como as técnicas de RMN bidimensional utilizadas neste trabalho, visam determinar a estrutura fina não usual da xiloglucana presente nas folhas de *Hymenaea courbaril*. Por outro lado, a comparação do índice de polidispersão e da conformação, determinadas por HPSEC-MALLS, das xiloglucanas de folhas e sementes de *Hymenaea courbaril*, tem por objetivo relacionar suas diferentes características moleculares às suas respectivas funções nas plantas.

O isolamento e caracterização dos oligossacarídeos derivados da xiloglucana fucosilada de *Hymenaea courbaril*, visam à confirmação da estrutura do polissacarídeo, bem como a investigação da atividade biológica dos mesmos. Além disso, a relação de determinados elementos estruturais, tais como a presença da unidade α -L-fucopiranosil na cadeia lateral do oligossacarídeo XXFG ou a sua ausência no XLLG, com a resposta biológica, atividade anti-auxínica ou ativação do crescimento celular (McDOUGALL e FRY, 1990), sugere que o desencadeamento das respostas iniciadas por estes oligossacarídeos estão relacionados a determinados elementos estruturais, indicando a presença de receptores altamente específicos nas células vegetais. Apesar da importância da atividade biológica dos oligossacarídeos, receptores específicos para estas moléculas não são conhecidos.

A ligação de oligossacarinas a seus receptores induzem respostas intracelulares. A atividade de glico-hidrolases pode ser induzida por oligossacarídeos livres relacionados as xiloglucanas (VARGAS-RECHIA et al., 1998). Além disso, a modulação da atividade destas hidrolases parece estar relacionada com a regulação da degradação das xiloglucanas na parede celular (LORENCE e FRY, 1993).

III. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Caracterizar a estrutura fina da xiloglucana fucosilada das folhas de *Hymenaea courbaril* através do isolamento e caracterização dos seus oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática e investigar a atividade biológica dos mesmos.

4.2. Objetivos específicos

- Obter e purificar a xiloglucana fucosilada das folhas de *Hymenaea courbaril*.
- Caracterizar a estrutura fina da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*.
- Analisar comparativamente a xiloglucana de sementes e folhas de *Hymenaea courbaril*, quanto ao índice de polidispersão e conformação.
- Produzir os oligossacarídeos derivados da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* através de hidrólise enzimática, com endo-(1→4)-β-D-glucanase de *Trichoderma viride* e com endoxiloglucanase *A. aculeata*.
- Isolar e caracterizar estruturalmente os oligossacarídeos e relacioná-los com a estrutura do polissacarídeo.
- Testar a atividade das xiloglucanas, intactas e hidrolisadas enzimaticamente, obtidas de folhas e sementes de *Hymenaea courbaril* sobre o sistema imune, utilizando células T.
- Testar a atividade das xiloglucanas, intactas e hidrolisadas enzimaticamente, obtidas de folhas e sementes de *Hymenaea courbaril*, em células tumorais (melanoma).
- Investigar a interação de oligossacarídeos fucosilados com receptores específicos em células cultivadas de *Rubus fruticosus* (amora preta).
- Testar o efeito de oligossacarídeos fucosilados sobre a indução de glico-hidrolases em células cultivadas de *Rubus fruticosus*.

V. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material e métodos gerais

Foi utilizado etanol com grau de pureza comercial para a precipitação dos polissacarídeos das soluções aquosas, apresentando os demais solventes e reagentes utilizados grau de pureza PA-ACS.

Os polissacarídeos obtidos por precipitação com etanol foram separados da fase líquida por centrifugação, lavados com etanol, e liofilizados em aparelho EDWARDS.

Para a remoção dos solventes foi utilizado evaporador rotatório, à vácuo, em temperatura inferior a 45 °C.

Para moagem das folhas foi utilizado um moinho WILEY e peneiras de 20 e 40 mesh, sucessivamente.

As centrifugações durante as etapas de extração e purificação dos polissacarídeos, foram realizadas em centrifugas HITACHI HIMAC CR 21E e SORVALL T6000D. A centrifugação dos protoplastos foi realizada em centrifuga BECKMAN J2-21 e a ultracentrifugação em aparelho BECKMAN XL-70.

A sonicação das células e protoplastos foram realizadas em sonicador THORNTON.

Açúcares totais foram determinados pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O padrão utilizado foi de glucose nas concentrações de 20-100 µg/mL e leitura de 490 nm. Os ácidos urônicos foram dosados pelo método do m-hidroxibifenil, desenvolvido por Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), sendo as leituras a 520 nm e o ácido D-glucurônico, em concentrações de 20-100 µg/mL, o padrão utilizado. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry modificado, Hartree (1972), sendo as leituras feitas a 660 nm. O padrão utilizado foi albumina bovina nas concentrações de 20-100 µg/mL.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro SPECTRONIC 20 GENESYS. As medidas de absorbância para os ensaios de ELISA foram realizadas em leitor para microplacas SIGMA DIAGNOSTICS.

4.2. Obtenção das folhas

As folhas de *Hymenaea courbaril* foram coletadas no campus da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, pela Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, do Departamento de Química e Física da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, onde um “voucher specimen” está depositado no herbário (SPFR), com o número 05312.

4.3. Deslipidificação e despigmentação

As folhas secas e moídas (250 g) foram despigmentadas e deslipidificadas com etanol absoluto durante 170 hrs, e tolueno-etanol (2:1) por 48 horas, em aparelho extrator de Soxhlet. O resíduo foi seco e utilizado nas extrações posteriores, segundo o esquema 1 (página 55).

4.4. Obtenção dos polissacarídeos das folhas

O resíduo deslipidificado e despigmentado (200 g) foi extraído com EDTA 2% aquoso por 3 horas a 25 °C. O resíduo foi submetido ao processo de deslignificação descrito por Wise et al. (1946), sendo tratado com 400 mL de solução aquosa contendo clorito de sódio (8,0 g) e ácido acético glacial (3 mL), pH 4,0, a 70 °C, durante 6 horas, sob pressão reduzida. Em seguida, foi lavado com etanol 95% fervente, solução de etanolamina 3% em etanol 95% fervente (2 vezes) e novamente com etanol 95% fervente (2 vezes), sendo cada lavagem por 3 min, sob agitação (GREEN, 1963).

A seguir o resíduo da deslignificação (150 g) foi submetido à extração aquosa a 60 °C, durante 6 horas e a sucessivas extrações alcalinas. Primeiramente tratado com KOH 1 mol/L, com adição de 10 mg de NaBH₄, durante 8 horas, sob atmosfera de N₂ por 3 vezes. A seguir, extraído com KOH 4 mol/L (3 vezes) sob as mesmas condições da extração alcalina anterior. Entre cada etapa de extração com KOH 4 mol/L foi realizada a lavagem do resíduo com água destilada, previamente a próxima extração alcalina. Cada extrato obtido da lavagem do resíduo foi adicionado a extração alcalina que o precedeu. Após a filtração, os extratos alcalinos a 4 mol/L foram tratados com solução de ácido acético 50% (v/v) até pH 5,0,

ocorrendo precipitação das frações de hemicelulose A (HA), separadas por centrifugação. Os sobrenadantes foram dialisados por 72 horas, contra água destilada, concentrados, tratados com etanol (3v) ocorrendo a precipitação da hemicelulose B (HB) (WHISTLER e FEATHER, 1965). Estas frações foram centrifugadas, lavadas com etanol e liofilizadas, sendo denominadas de frações IHB, IIHB e IIIHB.

4.5. Cromatografia de troca-iônica das frações IHB e IIHB

A fração IHB (3 g) e IIHB (1,1 g) foram cromatografadas em coluna de troca-iônica DEAE-Trisacryl Plus M (forma Cl⁻) de 20 cm × 3,8 cm (d.i.), eluídas sequencialmente com água deionizada e soluções aquosas de NaCl 0,5 e 2 mol/L, NaOH 0,5 mol/L e HCl 0,5 mol/L. Após as eluições as frações foram neutralizadas, quando necessário, dialisadas, concentradas e liofilizadas. Em todas as frações eluídas foi feito controle de açúcar total pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

4.6. Determinação da composição monossacarídica

4.6.1. Hidrólises ácidas totais

As hidrólises ácidas totais foram realizadas com TFA 1 mol/L, a 100 °C por 5 horas, em tubo hermeticamente fechado, de acordo com a curva de hidrólise realizada anteriormente (BUSATO, 1999). Ao final da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989).

4.6.2. Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise

Os monossacarídeos foram reduzidos na presença de NaBH_4 , por 2 horas em meio aquoso, a 25 °C (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Em seguida foi adicionada resina LEWATIT S-100 (forma H^+) para decompor o excesso de agente redutor e remover os cátions Na^+ . Após a filtração, as soluções foram concentradas até a secura. Lavagens sucessivas com 2 mL de MeOH (3 vezes), foram realizadas para remover o ácido bórico remanescente por co-destilação com MeOH, na forma de borato de trimetila. Os alditóis secos foram acetilados com piridina - anidrido acético (1:1 v/v) durante 12 h a 25 °C (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Este processo foi interrompido com a adição de gelo moído, e os acetatos de alditóis extraídos com 2 mL de CHCl_3 . A piridina residual na fase clorofôrmica foi eliminada por lavagens sucessivas com solução aquosa de CuSO_4 a 5%, formando-se um complexo azul solúvel em água. A fase clorofôrmica foi lavada sucessivas vezes com água destilada, evaporada a 25 °C e analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC) (SLONEKER, 1972).

As análises por GLC foram realizadas em cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 A II, equipado com detector de ionização de chama, utilizando N_2 como gás de arraste, com fluxo de 2 mL/min. Utilizou-se uma coluna capilar [30 m x 0,25 mm (d.i.)] DB-225, com espessura de filme 0,25 μm , sendo a temperatura do detector 300 °C e do injetor 250 °C.

4.7. Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC)

Esta análise foi realizada para os polissacarídeos e frações $\text{H}_{\text{XG-1}}$ de sementes e folhas de *Hymenaea courbaril*. As frações $\text{H}_{\text{XG-1}}$ foram obtidas através de hidrólise enzimática dos polissacarídeos e correspondem a fração eluída no volume morto da coluna de Bio-Gel P-2. A xiloglucana e a fração $\text{H}_{\text{XG-1}}$ das sementes foram cedidas pela Profª. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia.

As amostras foram solubilizadas em solução de NaNO_3 0,1 mol/L na concentração de 1 mg/mL e filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,2 μm . Em seguida foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas 4 colunas de gel

permeação WATERS, com limites de exclusão de 1.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 e 5.10^3 , em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_3 0,1 mol/L contendo NaN_3 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min, pressão de 920 psi a 30 °C, monitorados através de bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) da xiloglucana de sementes e folhas de *Hymenaea courbaril* foi determinada, sendo que para cada amostra foram utilizadas 5 concentrações. Para isto, foi preparada uma solução na concentração de 0,5 mg/mL em NaNO_3 0,1 mol/L, filtrada em membrana de 0,2 μm , sendo então diluída nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, e 0,4 mg/mL.

A massa molecular numérica média (M_n) foi determinada com base no número de moléculas (N_i) da espécie i , de massa molecular M_i , segundo a equação (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001):

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

A massa molecular ponderal média (M_w) foi calculada a partir de médias baseadas na fração de massa (w_i) das moléculas de uma determinada massa molecular (M_i), de acordo com a equação:

$$M_w = \frac{\sum w_i M_i}{\sum w_i} = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

4.8. Análise de metilação do polissacarídeo

A xiloglucana das folhas de *Hymenaea courbaril* (10 mg) foi solubilizada em Me_2SO (1 mL) e metilada pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Após a solubilização, adicionou-se 50 mg NaOH pulverizado e seco, e o sistema foi agitado em aparelho Vortex por 10 minutos. A seguir, acrescentou-se 0,5 mL do agente metilante, CH_3I , sendo a mistura agitada por mais 10 minutos. Após a acidificação com HOAc, foi adicionado água gelada, e os produtos *O*-metilados foram extraídos com CHCl_3 . Este processo foi repetido duas vezes.

4.8.1. Hidrólise do polissacarídeo metilado

A amostra do polissacarídeo metilado foi submetida à metanólise com solução de metanol contendo 3% de HCl gasoso, em estufa a 100 °C, por 2 horas. Em seguida foi adicionado carbonato de prata para a eliminação do ácido na forma insolúvel de cloreto de prata. Após filtração, a amostra foi evaporada à secura sob pressão reduzida e submetidas à hidrólise com 1,5 mL de ácido sulfúrico 0,5 mol/L, durante 14 horas, a 100 °C. O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário.

4.8.2. Derivatização à acetatos de alditóis e aldonitrilos acetilados

a) a acetatos de alditóis: os monossacarídeos parcialmente metilados foram reduzidos com NaBD₄ e acetilados conforme descrito no item 4.6.2., sendo os acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados resultantes analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

As análises por GC-MS foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN-MAT, utilizando colunas capilares de 30 m x 0,25 mm (d.i.), DB-225 e DB-210. Foi utilizado hélio com gás de arraste (1 mL/min), sendo a temperatura inicial de 50 °C, seguida de um gradiente de 40 °C/min até 220 °C (para a coluna DB-225) e até 180 °C (para a coluna DB-210). Esta última foi empregada para separar os acetatos de 2,3,4-Me₃-fucitol e 2,3,4-Me₃-xilitol. As áreas dos picos foram obtidas por integração automática e a identificação foi feita com base nos seus perfis de fragmentação característicos (JANSSON et al., 1976; CARPITA e SHEA 1989).

b) a aldonitrilos acetilados: os monossacarídeos parcialmente metilados foram tratados com piridina (1 mL) e cloridrato de hidroxilamina (10 mg), por 30 minutos à 80 °C (LANCE e JONES, 1967; NOSEDA, 1994). A acetilação foi realizada conforme descrito no item 4.6.2.. Os aldonitrilos acetilados parcialmente *O*-metilados resultantes foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), utilizando-se coluna BD-225. Padrões autênticos de 2,3-di-*O*-metil-xilose e 3,4-di-*O*-metil-xilose foram cedidos pelo Dr. Philip A .J. Gorin. Estes metil alditóis acetatos também foram convertidos a aldonitrilos acetilados.

4.9. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As determinações de RMN foram realizadas em dois aparelhos diferentes: a) aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400, com ressonância de ^1H e ^{13}C , de 100 e 400 MHz respectivamente, temperatura de 50 ou 70 °C para o polissacarídeo e 30 °C para os oligossacarídeos. b) BRUKER, modelo DRX-500, com ressonância de ^1H e ^{13}C , de 125 e 500 MHz respectivamente, temperatura de 80 °C. As análises neste último foram realizadas pelo Ms. Daniel Esdras Uchoa, sob orientação do Prof. Dr. Edilberto Rocha da Silveira, do CENAUREMN (Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, em relação ao padrão interno acetona com δ de 30,2 ppm para ^{13}C -RMN e 2,224 ppm para ^1H -RMN.

4.10. Hidrólise enzimática da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*

A hidrólise do polissacarídeo foi realizada utilizando-se duas endoglucanases obtidas de fontes diferentes. A enzima endoxiloglucanase II, XG5, de *A. aculeata*, foi doada pelo Dr. Schülein (NOVO NORDISK, Dinamarca), sendo a mistura de oligossacarídeos obtidos denominada de fração H_{XG} . A endoglucanase de *Trichoderma viride*, EG, (MEGAZYME) foi cedida pelo Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge, da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica (São Paulo-SP), sendo os oligossacarídeos resultantes chamados de fração H_{XG}' . O material hidrolisado com XG5 foi utilizado para cromatografia semi-preparativa e analítica, enquanto que o obtido com EG somente para cromatografia analítica.

A xiloglucana (fração XG, 200 mg), solubilizada em 200 mL de água, foi digerida a 37 °C com 2 mg da enzima endoxiloglucanase II (XG5) (NOVO NORDISK), sendo retiradas alíquotas de 0,1 mL nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos, nas quais foram feitas dosagens de açúcar redutor pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945). Para a curva padrão de hidrólise foi utilizado glucose nas concentrações de 20-100 $\mu\text{g/mL}$, a fim de monitorar a hidrólise. Após 5 horas a reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 5 min, seguindo-se de centrifugação, concentração e liofilização do

sobrenadante (fração H_{XG}).

À xiloglucana (fração XG, 5 mg) solubilizada em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) foi hidrolisada com 200 µL de celulase *Trichoderma viride* (MEGAZYME, 500 U/L em tampão sulfato de amônio 3,2 mol/L, pH 7,0), por 24 horas a 30 °C. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 5 min, seguindo-se de filtração (fração H_{XG}’).

4.11. Cromatografia analítica do hidrolisado enzimático

As frações H_{XG} e H_{XG}’ foram analisadas em HPLC com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD; “high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection”) utilizando-se coluna CARBOPAK PA-100 (DIONEX). A separação foi realizada em NaOH 88 mmol/L (constante) com um gradiente linear de acetato de sódio de 35 mmol/L a 75 mmol/L durante 20 minutos, seguido por outro gradiente linear de 75 a 200 mmol/L até 50 minutos (fluxo de 0,9 mL/min). Estas análises foram realizadas na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica (São Paulo-SP), sob orientação do Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge.

4.12. Cromatografia semi-preparativa do hidrolisado enzimático

4.12.1. Cromatografia de gel permeação da fração H_{XG}

Foram utilizadas duas colunas termostatizadas (50 °C) acopladas em série, apresentando cada uma dimensões de 100 cm × 1,5 cm d.i., preenchidas com gel de poliacrilamida (BIOGEL-P2, BioRAD), utilizando-se água como eluente. O fluxo de 0,5 mL/min foi controlado por bomba peristáltica PUMP P1. As amostras foram coletadas em coletor automático REDIFRAC 100, ambos da PHARMACIA. O volume morto (125 mL) foi obtido por meio da eluição do “Blue Dextran”, correspondendo ao volume de eluente equivalente ao pico de máxima absorção a 660 nm. A eficiência da coluna foi testada, utilizando-se soluções padrões de maltose e maltopentaose a 30 mg/mL, sendo que os tempos de retenção correspondem a 280 mL e 230 mL, respectivamente. Para a separação da fração H_{XG} foram aplicadas alíquotas contendo 50 mg/mL. O perfil de eluição foi determinado pelo

método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), sendo os eluatos obtidos agrupados em quatro frações principais denominadas H_{XG-1} , H_{XG-2} , H_{XG-3} , H_{XG-4} , com massas moleculares decrescentes.

4.12.2. Cromatografia de gel permeação da fração H_{XG-1}

A fração H_{XG-1} (30 mg/mL) foi aplicada em uma coluna com dimensões de 100 cm $\times$ 1,5 cm d.i., preenchida com gel de poliacrilamida (BIOGEL-P60, BioRAD), utilizando-se água como eluente. O fluxo de 0,1 mL/min foi controlado por bomba peristáltica PUMP P1 (PHARMACIA). As amostras foram coletadas em coletor de frações automático REDIFRAC 100 (PHARMACIA). O perfil de eluição foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O volume morto (60 mL) foi obtido por meio da eluição do “Blue Dextran”, correspondendo ao volume de eluente equivalente ao pico de máxima absorção a 660 nm.

4.12.3. Isolamento dos oligossacarídeos por HPLC

As frações H_{XG-2} , H_{XG-3} foram aplicadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) SHIMADZU, sendo utilizadas as seguintes colunas semi-preparativas de gel permeação de fase reversa: SUPELCOSIL PLC-18 (25 cm $\times$ 21,2 mm) e SHIM-PACK PREP-ODS PN (25 cm $\times$ 20 mm). Foram utilizados como eluentes metanol:água, nas concentrações de 7%, 5% e 3% de metanol. O fluxo de 1,5 mL/min foi controlado por bomba peristáltica LC-10AD. A eluição dos oligossacarídeos foi monitorada por detector de índice de refração diferencial RID 10A e coletados em coletor de frações FRC-10A.

4.13. Caracterização estrutural dos oligossacarídeos

As análises de RMN bidimensionais dos oligossacarídeos foram realizadas conforme descrito no item 4.9.

As determinações de ESI-MS (Espectrometria de massa de ionização por “electrospray”), foram realizadas em dois aparelhos diferentes: a) MICROMASS QUATTRO

LC, com duplo quadrupolo, modo positivo, sendo a voltagem do capilar de 3.7 V e do cone de 20 V. O eluente utilizado foi acetonitrila 80%, com fluxo de 0,1 mL/min, controlado por bomba peristáltica LC-10AD (SHIMADZU). Os oligossacarídeos foram solubilizados em água, sendo posteriormente adicionada acetonitrila para uma concentração final de 80%. b) MICROMASS QUATTRO II, com triplo quadrupolo, modo positivo, sendo a voltagem do capilar de 2.5 V e do cone de 41 V. O eluente utilizado foi metanol, sendo as amostras solubilizadas em metanol: água 5:1. As análises neste último foram realizadas pelo Dr. José César Rosa, do Laboratório de Química de Proteínas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), USP-SP.

4.14. Ensaios biológicos em células humanas

Estes experimentos foram realizados no Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), USP-SP, sob a orientação do Prof. Dr. Auro Nomizo.

4.14.1. Meio de cultura celular

Para a manutenção das células tumorais e esplênicas, dissolução dos polissacarídeos e oligossacarídeos e realização dos ensaios de atividade biológica, foi utilizado o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 20 mmol/L de L-glutamina, 7,5% de bicarbonato de sódio e 10 µg/mL de gentamicina (meio completo). A esterilização do meio de cultura foi realizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

4.14.2. Preparação das amostras para os testes biológicos

As amostras utilizadas foram xiloglucana das sementes (XG-S), xiloglucana das folhas (XG-F), oligossacarídeos das sementes (H_{XG-S}), oligossacarídeos das folhas (H_{XG-F}). Os oligossacarídeos das sementes (H_{XG-S}) e de folhas (H_{XG-F}) foram obtidos por hidrólise enzimática das xiloglucanas (XG-S e XG-F). Os polissacarídeos (5 mg), solubilizados em água, foram hidrolisados com 200 µL de celulase *Trichoderma viride* (MEGAZYME, 500 U/L) por 24 horas a 37 °C. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 5 min,

seguinte-se de centrifugação e liofilização do sobrenadante. Todas as amostras foram solubilizadas no meio de cultura RPMI 1640 (completo), centrifugadas e filtradas em membranas de 0,22 μm .

4.14.3. Ensaio em células tumorais

A linhagem tumoral humana B16F10 (Melanoma) foi obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). As células foram mantidas em criopreservação em nitrogênio líquido em solução de congelamento: meio RPMI 1640 contendo Me_2SO (10% v/v) e de soro bovino fetal (10% v/v). Para a expansão das células tumorais *in vitro*, as células foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C e cuidadosamente adicionadas ao meio de crescimento RPMI 1640 completo e expandidas em frascos de cultura celular, à temperatura de 37 °C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO_2 .

As linhagens tumorais em crescimento logarítmico foram removidas dos frascos de cultura celular por adição de solução de tripsina 0,5% em tampão fosfato a 0,01 mol/L e agitação manual por 60 segundos e lavagem das células 3 vezes por centrifugação. Após contagem em câmara de Neubauer as células foram ressuspensas à concentração final de 5×10^5 células/mL em meio RPMI 1640 completo, sendo plaqueadas em placas de 96 poços, sendo incubadas por 24 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar. Após este período, o meio de cultura foi retirado, sendo adicionado novo meio contendo ou não as amostras nas concentrações de 1, 10, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo foi utilizada a droga metotrexato (MTX) nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. As células tumorais foram incubadas por mais 24 horas em estufa à temperatura de 37 °C.

4.14.4. Ensaios em células esplênicas de camundongos

Nestes ensaios foram utilizados preparações de células totais de baço de animais da linhagem BALB/C nu/nu, lavadas 3 vezes por centrifugação e ressuspensas em meio completo RPMI 1640 a uma concentração de 2×10^6 células/mL. Para avaliar a atividade proliferativa das células esplênicas, suspensões contendo $2,5 \times 10^5$ células em 200 μL foram incubadas com as diferentes amostras XG-S, XG-F, $\text{H}_{\text{XG-S}}$ e $\text{H}_{\text{XG-F}}$, nas concentrações de 1, 10

e 100 µg/mL, na presença ou na ausência de anti-CD3 1,35 µg/mL, em placa de 96 poços. As células foram cultivadas durante 72 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar.

4.14.5. Teste de viabilidade celular

O método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade mitocondrial das células vivas (MOSMANN, 1983). Ao fim da incubação das células tumorais por 24 horas e das células esplênicas por 72 horas, foram adicionados 10 µL de MTT na concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 °C. Após este período, foram acrescentados 50 µL de solução a 10% de dodecil sulfato de sódio/HCl 0,01 mol/L. Após 16 horas, foi realizada a quantificação da densidade óptica em espectrofotômetro (leitor para microplacas) a 540 nm. Os dados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão.

4.15. Preparação da neoglicoproteína

A ligação dos oligossacarídeos à albumina foi realizada segundo o método de Roy, Katzenellenbogen e Jennings (1984), utilizando-se oligossacarídeos (H_{XG-F}) obtidos por hidrólise das xiloglucanas de folhas de *Hymenaea courbaril*. Foram utilizados 20 mg de H_{XG-F} (292 µmol), 3,4 mg de BSA (1 µmol) e 5 mg de cianoboroidreto de sódio (1,59 mmol), dissolvidos em 0,5 mL de tampão borato 0,2 mol/L (pH 8,0). A amostra foi mantida sob agitação constante a 40 °C, durante 10 dias.

O monitoramento do acoplamento dos oligossacarídeos com BSA foi realizado por T.L.C., utilizando-se como sistema solvente benzeno-n-butanol-piridina-água (1:5:3:3 v/v) e como revelador solução de orcinol.

Após 10 dias de reação, as amostras foram neutralizadas com ácido acético a 80 % até pH 4,0, e recuperadas por filtração, em membrana de 10 KDa (ULTRAFREE ME, MILLIPORE). A membrana foi previamente saturada com BSA para evitar a fixação da neoglicoproteína. A quantidade de açúcar (2,2 mg) que foi acoplado a BSA foi determinada pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A eficiência do acoplamento foi

determinada considerado-se que a fração H_{XG-F} é composta por XXXG, XXFG, XLFG em proporções iguais.

4.16. Preparação e imunodifusão de anticorpos anti-neoglicoproteína

Estes experimentos foram realizados na disciplina de Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP-SP, pela Farmacêutica Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini. Os coelhos foram imunizados com a neoglicoproteína (4 mg) H_{XG-F} ~BSA. O antígeno (1 mg) foi injetado por via subcutânea a cada 7 dias, durante 4 semanas sucessivas. Uma semana após a última injeção, o sangue do animal foi coletado, centrifugado, sendo o soro utilizado para avaliar a produção de anticorpos por imunodifusão (SONE, MISAKI e SHIBATA, 1989). A difusão do soro foi realizada em ágar ou Gelrite dissolvido em PBS, contra os oligossacarídeos (H_{XG-F}), BSA e as neoglicoproteínas.

4.17. Preparação das células cultivadas de *Rubus fruticosus*

As células de *Rubus fruticosus* foram cedidas pelo Dr. Jean Paul Joseleau do Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), Grenoble, França. Estas células foram cultivadas *in vitro* por técnica de suspensão celular, pela Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP). As células foram crescidas em meio Heller (1953) sob agitação, a 25 °C, sob iluminação durante 12 horas, por intervalo de 24 horas. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer (BIOBLOCK) com utilização de microscópio.

4.18. Preparação dos protoplastos

Os protoplastos de *Rubus fruticosus* foram preparados a partir de células de 20 dias. As células foram filtradas em membrana de 100 μ m, lavadas com meio de Heller, ressuspensas em meio de Heller enriquecido com manitol 0,56 mol/L e sacarose 0,06

mol/L, contendo também Caylase 345 (0,25% p/v) e Caylase M3 (0,01% p/v), distribuídas em placas de Petri e incubadas 18 h a 4°C. Os protoplastos foram recuperados por filtração em membrana de 100 µm, centrifugados a 153 g, 8 min, 4°C. O sedimento foi suspenso no mesmo meio, porém sem Caylase (meio osmótico) contendo 6% de Ficoll 400 e centrifugado novamente nas condições descritas acima. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em meio osmótico e centrifugados novamente (VARGAS-RECHIA et al, 1998). O sedimento (protoplastos), solubilizado no meio adequado para cada experimento, foi utilizado para a obtenção de proteínas de membrana, utilizadas nos ensaios de interação oligossacarídeo-receptor e para determinação da atividade de hidrolases.

4.19. Preparação da fração microssomal

Os microssomos foram preparados a partir dos protoplastos, homogeneizados em tampão Tris-HCl (25 mM, pH 7,4) contendo sacarose 0,25 mol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, DTT 2 mmol/L e PMSF 1 mmol/L, a 0 °C utilizando-se sonicador a 50 w, 10 vezes, 15 s. Os protoplastos homogeneizados foram centrifugados a 4 °C, 12.000 g, 15 min, e o sobrenadante centrifugado novamente, a 4 °C, 100.000 g, 120 min. O precipitado (microssomos) foi utilizado para purificação das proteínas de membrana.

4.20. Extração das proteínas da membrana

Os microssomos foram suspensos em tampão Tris-HCl (25 mM, pH 7,4), contendo sacarose 0,25 mol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, DTT 2 mmol/L e PMSF 1 mmol/L, CaCl₂ 0,45 mmol/L e CHAPS 2% (p/v), e sonicados (40 w, 10 vezes, 20 s). As proteínas solubilizadas foram centrifugadas a 4 °C, 50.000 g, 120 min. O precipitado (proteínas de membrana) foi utilizado para os testes de ligação dos oligossacarídeos a receptor de membrana. A concentração de proteínas de membrana obtida foi determinada.

4.21. Determinação da atividade de ligação a receptor de membrana por Elisa

A atividade de ligação dos oligossacarídeos fucosilados ao receptor de membrana foi determinada utilizando-se as proteínas isoladas da membrana plasmática de *Rubus* em placa ELISA de fundo chato e alta afinidade. Nestes experimentos foi utilizado o anticorpo monoclonal de murina CCRC-M1 (PUHLMANN et al., 1994), que reconhece epítomos contendo fucose. Este anticorpo foi cedido pelo Dr. Marcos Silveira Buckeridge, da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica (São Paulo-SP) e fornecido pelo Dr. Michael G. Hahn, do Departamento de Biologia de Plantas, Universidade de Geórgia, Geórgia, U.S.A. O anticorpo anticorpo α -camundongo-biotina e a estreptovidina marcada com peroxidase foram cedidos pelo Prof. Dr. Auro Nomizo, do Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), USP-SP.

O procedimento foi realizado em sete etapas, todas a temperatura ambiente, sendo que entre cada etapa foi realizada a lavagem dos poços com tampão PBS (10 mmol/L, pH 7,4) contendo Tween 0,05%, por 3 vezes: (a) 500 ng de proteínas de membrana, dissolvidas em 100 μ L de tampão PBS, foram fixadas em placa de Elisa, por 8 horas; (b) 100 μ L de solução de BSA 1 % em tampão PBS por 1 hora; (c) 100 μ L de solução do oligossacarídeo XLFG em concentrações de 0,78 até 100 μ mol/L durante 3 horas; (d) 50 μ L de anticorpo CCRC-M1 diluído 1:500 em tampão PBS por 2 horas; (e) 50 μ L de anticorpo α -camundongo-biotina diluído 1:4000 em tampão PBS durante 2 horas; (f) 50 μ L de estreptovidina marcada com peroxidase diluída 1:10000 em tampão PBS durante 2 horas; (g) 100 μ L de tampão Na_2HPO_4 (0,05 mol/L, pH 5,0) contendo o substrato para a peroxidase (diidrocloreto de *o*-fenilenediamina 0,8 mg/mL e H_2O_2 0,03% (v/v); CALBIOCHEM). A atividade da peroxidase foi determinada através da medida de absorbância a 492 nm em leitor para microplacas. Os controles utilizados foram: (a) com as proteínas de membrana sem oligossacarídeo XLFG, (b) sem as proteínas de membrana e oligossacarídeo XLFG, sendo que em ambos os controles os outros reagentes não foram alterados. Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Para se testar a eficiência dos anticorpos e determinar as condições ideais do experimento foram realizados ensaios preliminares utilizando-se como revestimento a neoglicoproteína $H_{XG-F} \sim BSA$ em tampão carbonato 0,2 mol/L (pH 9,8) ou tampão PBS (10 mmol/L, pH 7,4). A neoglicoproteína foi utilizada nas concentrações de açúcar total de 10, 20, 40, 80, 160, 200 e 2000 nmol/L, determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Os controles foram: (a) sem a neoglicoproteína, utilizando como revestimento BSA e com anticorpo CCRC-M1, (b) com a neoglicoproteína e sem CCRC-M1 e (c) sem a neoglicoproteína, utilizando como revestimento BSA, com 200nmol/L da fração H_{XG-F} e com o anticorpo CCRC-M1. Os outros reagentes não foram alterados. Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.22. Determinação da atividade de hidrolases

4.22.1. Bioensaios

Os protoplastos foram suspensos em tampão Bis-Tris/HCl (25 mmol/L; pH 4,8) contendo manitol 0,56 mmol/L, sacarose 0,06 mmol/L, KCl 10 mmol/L e $CaCl_2$ 1 mmol/L, na presença ou não do decassacarídeo XLFG, obtido por hidrólise enzimática da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*. As induções foram realizadas em concentrações de até 100 nmol/L de oligossacarídeo, a 25 °C, durante 15 minutos. As incubações foram interrompidas colocando-se as amostras em gelo e os protoplastos recuperados por centrifugação, sendo utilizados para a extração das proteínas.

4.22.2. Extração e dosagem das proteínas

As proteínas foram extraídas em tampão Tris-HCl 50 mmol/L (pH 7,2) contendo NaCl 1 mol/L. Cada amostra foi sonicada 4 vezes (60 W; 25 s), centrifugadas a 4 °C (12.000 g, 15 min), sendo os sobrenadantes dialisados em unidades de ultrafiltração (ULTRAFREE ME, MILLIPORE de 10 KDa), e lavadas 2 vezes com água destilada (1 mL). A concentração de proteínas obtida a partir de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), em microplacas, utilizando-se 160 μ L da amostra ou padrão e 40 μ L do reativo, tempo de incubação de 5 minutos e leitura a 600 nm. O padrão utilizado foi BSA nas concentrações de 2,5 a 25 μ g/mL

4.22.3. Ensaio de atividade enzimática

As atividades da α -D-xilosidase, β -D-xilosidase, β -D-galactosidase e α -L-fucosidase foram testadas em placa ELISA, utilizando-se 20 μ L de substrato (*p*-nitrofenil- α -D-xilosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-xilosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-galactosídeo e *p*-nitrofenil- α -L-fucopiranosídeo, respectivamente) a 2 mg/mL e 80 μ L de tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 5,0) contendo 1 μ g de proteína. O sistema foi incubado a 40 °C, durante 0, 15, 30, 45 e 60 minutos e a reação interrompida com 100 μ L de carbonato de sódio 0,1 mol/L. A atividade enzimática foi determinada pela medida da absorbância dos íons *p*-nitrofenolato a 410 nm (LEE e ZEIKUS, 1993). Controles (sem proteínas de membrana ou sem o substrato) foram realizados para cada amostra. Para cada concentração analisada foram feitos 2 experimentos de indução independentes. Cada ponto da cinética foi testado em triplicata.

As velocidades das reações enzimáticas foram calculadas a partir das equações das retas, usando o software Excel. A ativação foi expressa como **R**, que corresponde à relação entre a inclinação das curvas obtidas pelas amostras de protoplastos tratados com os efetores contra os protoplastos suspensos em tampão sem os oligossacarídeos (controle).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

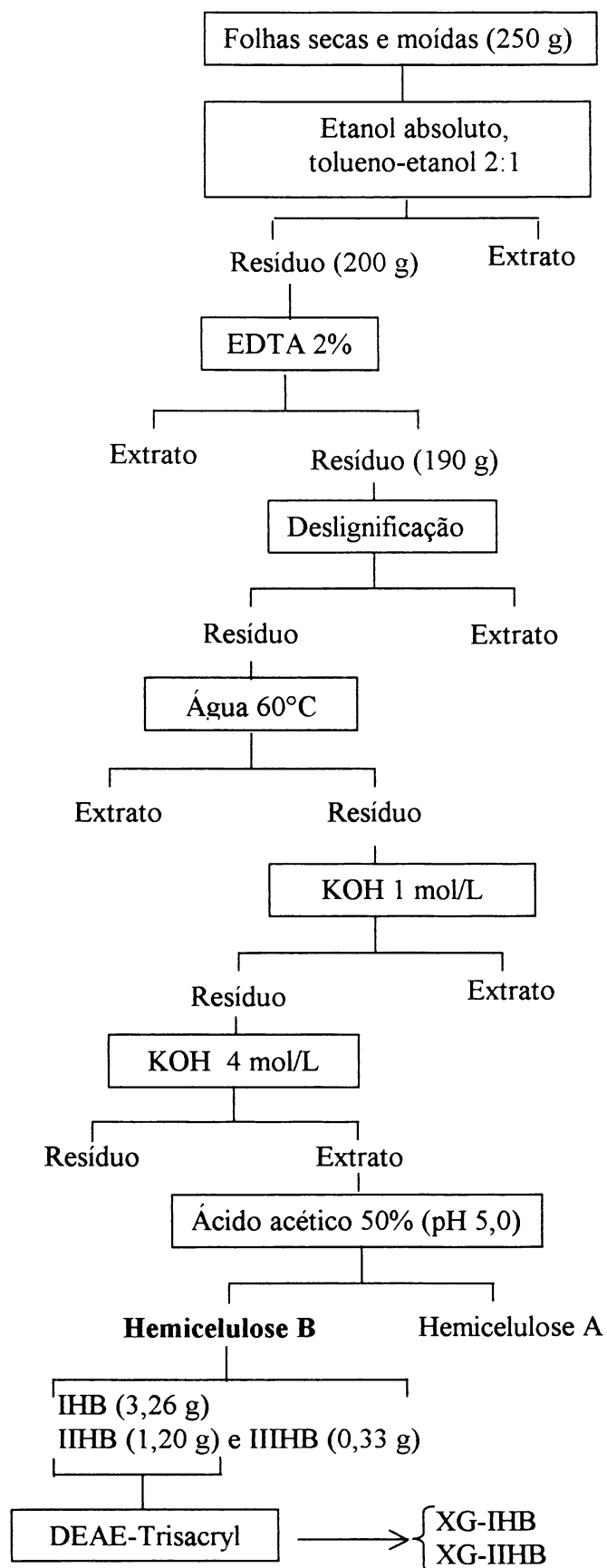
5.1. Obtenção e purificação do polissacarídeo de folhas de *Hymenaea courbaril*

Com o objetivo de se obter a xiloglucana fucosilada, as folhas deslipidificadas foram primeiramente submetidas à extração com EDTA 2%, deslignificação, extração aquosa a 60 °C, e com KOH 1 e 4 mol/L, segundo o esquema 1 (página 55). A extração com EDTA 2% foi realizada para se retirar os polissacarídeos pécticos. Como os polissacarídeos hemicelulósicos são preferencialmente extraídos após a deslignificação, esta foi realizada pelo método descrito por Whistler e Feather (1965), que utiliza clorito de sódio na presença de ácido acético. Após a deslignificação, foi realizada extração aquosa a 60 °C, afim de se retirar os polissacarídeos pécticos remanescentes previamente ao início das extrações alcalinas. As extrações com álcali 1 e 4 mol/L foram repetidas por três vezes em cada concentração, para que ocorresse a máxima extração das hemiceluloses.

As frações obtidas com KOH 1 mol/L apresentaram em sua composição monossacarídica, alta concentração de xilose e ácidos urônicos (BUSATO, VARGAS-RECHIA, REICHER, 1999), e baixa concentração de fucose e glucose, indicando que não ocorreu extração significativa de xiloglucanas nestas frações.

Davis, Harris e Newman (2002) estudaram as alterações moleculares nas microfibrilas de celulose após a extração dos polissacarídeos de parede celular primária de folhas de *Arabidopsis thaliana* através de espectroscopia de ¹³C-RMN no estado sólido. Após extração com CDTA e Na₂CO₃ aquosos, os resultados obtidos indicaram que um possível aumento nas interações moleculares entre polissacarídeos não-celulósicos, provavelmente xiloglucanas e galactoglucomanas, e as microfibrilas de celulose, o que não foi observado no espectro da parede celular sem tratamento. No entanto, os resultados obtidos indicaram que esta interação pode ser revertida por subsequente tratamento com KOH 4 mol/L, o que confirma a observação de Fry (1989) de que alta concentração de álcali é necessária para desfazer as pontes de hidrogênio entre a celulose e as xiloglucanas.

Esquema 1. Procedimento de extração para obtenção da xiloglucana de folhas do jatobá.



Durante a neutralização das três frações obtidas por extração com KOH 4 mol/L, ocorreu a precipitação da hemicelulose A (BUSATO, VARGAS-RECHIA, REICHER, 1999), sendo os precipitados separados por centrifugação. Cada sobrenadante, após diálise e concentração, foi tratado com etanol, ocorrendo precipitação das frações de hemicelulose B (frações IHB, IIHB e IIIHB). Os rendimentos e teores de açúcar total e proteína das frações IHB, IIHB e IIIHB foram determinados, sendo mostrados na Tabela I. As frações foram hidrolisadas e os produtos analisados por GLC na forma de acetatos de alditóis, conforme apresentado na Tabela II, onde estão mostrados também as proporções de ácidos urônicos, determinados por método colorimétrico.

Tabela I. Rendimento e determinação de carboidratos e proteínas das frações de hemicelulose B obtidas das folhas de *Hymenaea courbaril*.

Fração	Massa (g)	Rendimento ^a (%)	Açúcar total (%)	Proteínas (%)
IHB	3,3	2,2	73,4	8,3
IIHB	1,2	0,8	60,0	15,2
IIIHB	0,3	0,2	76,1	11,9

(a): Em relação às folhas deslipidificadas, deslignificadas e despectinizadas.

Tabela II. Composição monossacarídica das frações de hemicelulose B obtidas das folhas de *Hymenaea courbaril*.

Fração	mol % ^a							Ácido urônico ^b
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
IHB	1,3	3,2	12,5	42,5	1,1	10,0	17,7	11,7
IIHB	1,8	1,6	22,1	38,4	1,1	9,5	10,6	14,9
IIIHB	2,8	1,7	15,5	43,8	2,3	8,2	12,2	13,5

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

(b): determinado pelo método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), em relação ao açúcar total, utilizando-se como padrão o ácido D-glucurônico.

Renard, Lemeunier e Thibault (1995) analisaram a extração da xiloglucana de polpa de maçã despectinizada com relação a diferentes parâmetros e concluíram que o rendimento de xiloglucana aumenta com concentrações de álcali e tempos de extração crescentes, sendo que as condições selecionadas foram KOH 4 mol/L, na presença de NaBH₄. Com relação ao tempo de extração, foi observado que o rendimento aumenta quatro vezes acima de oito horas de extração e então atinge um platô. O efeito do tempo de extração pode ser devido à difusão de álcali para dentro da parede celular, ou a solubilização da xiloglucana para fora da matriz da parede. O aumento da concentração de álcali provavelmente leva a ruptura das pontes de hidrogênio entre as xiloglucanas e as microfibrilas de celulose.

Após cada etapa da extração da xiloglucana de *Hymenaea courbaril* com KOH 4 mol/L foi realizada a lavagem do resíduo com água destilada. Edelman e Fry (1992), utilizando cultura de células em suspensão de rosa, observaram que os melhores rendimentos durante a extração de xiloglucanas foram obtidos quando os resíduos da primeira extração alcalina eram lavados com água antes do início do segundo tratamento alcalino.

A xiloglucana fucosilada de folhas de *Hymenaea courbaril* pode ser obtida a partir da purificação das frações de hemicelulose B (BUSATO, 1999), pois as xiloglucanas de parede celular estão firmemente ligadas à celulose, sendo solubilizadas por agitação com álcali concentrado. A xiloglucana extraída com KOH 4 mol/L, após a neutralização apresentou-se igualmente solúvel em água, conforme já observado anteriormente (FRY, 1989).

As frações de hemicelulose B apresentaram fucose, galactose, xilose e glucose (Tabela II) indicando uma possível presença de xiloglucanas nestas frações. No entanto, as altas proporções de xilose, e a presença de ácidos urônicos, indicaram que estas frações continham também xilanas ácidas. As frações IHB e IIHB foram escolhidas para purificação devido ao seu maior rendimento. Considerando-se que as xiloglucanas são polissacarídeos neutros, as frações IHB e IIHB foram cromatografadas em coluna de troca-iônica DEAE-Trisacryl Plus M. A xiloglucana purificada foi obtida através de eluição com água, sendo as frações denominadas de XG-IHB e XG-IIHB. A proporção de xiloglucana purificada em relação ao material aplicado na coluna foi de aproximadamente 30%. Os resultados estão apresentados na Tabela III.

Tabela III. Composição monossacarídica das xiloglucanas obtidas por fracionamento em DEAE-Trisacryl Plus M das frações I HB e IIHB.

Fração	Mol % ^a							Ácidos urônicos ^b
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
XG-IHB	0,6	7,4	1,4	32,7	2,1	13,3	42,5	-
XG-IIHB	1,3	7,2	2,6	27,0	3,6	13,0	45,3	-

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

(b): determinado pelo método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), em relação ao açúcar total, utilizando-se como padrão o ácido D-glucurônico.

As frações XG-IHB e XG-IIHB apresentaram 78,6% e 74,3% de açúcar total, respectivamente. O teor de proteínas foi de 1,2% para XG-IHB e 2% para XG-IIHB. Além da remoção de polissacarídeos ácidos e proteínas, através deste fracionamento foi possível também a retirada de pigmentos, pois as frações que eram escuras antes da cromatografia tornaram-se límpidas.

A amostra XG-IHB, por apresentar um maior rendimento que a amostra XG-IIHB, e por ser homogênea através de análise de HPSEC-MALLS (Figura 8), foi utilizada para a análise da estrutura fina do polissacarídeo e para hidrólise enzimática.

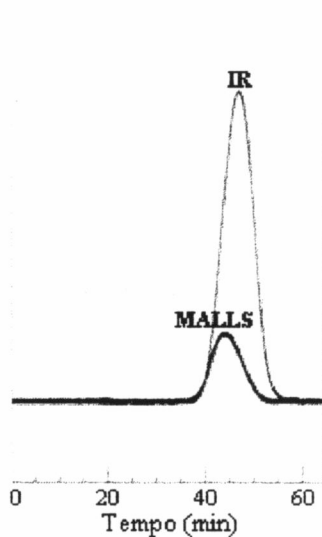


Figura 8. Perfil de eluição da xiloglucana obtida das folhas de *Hymenaea courbaril*, por HPSEC.

O índice de polidispersão para a xiloglucana de folhas e sementes de *Hymenaea courbaril* foi determinado por HPSEC-MALLS. O gráfico de % de massa molecular cumulativa versus massa molar para estes polissacarídeos está apresentado na Figura 9.

Na cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), é possível a determinação simultânea da massa molecular numérica média (M_n), massa molecular ponderal média (M_w) e da distribuição de massa molecular. A massa molecular de um polissacarídeo não pode ser calculada como normalmente é feito com compostos puros de baixa massa molar. Os polímeros de carboidrato consistem de um agrupamento de moléculas de vários tamanhos, ou seja, exibem normalmente uma distribuição de massa molecular, sendo denominados polidispersos. O índice de polidispersão corresponde à razão entre a massa molecular ponderal média e a massa numérica média M_w/M_n . Para amostras monodispersas, os valores de M_w e M_n são praticamente idênticos, e a polidispersão é igual a unidade (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

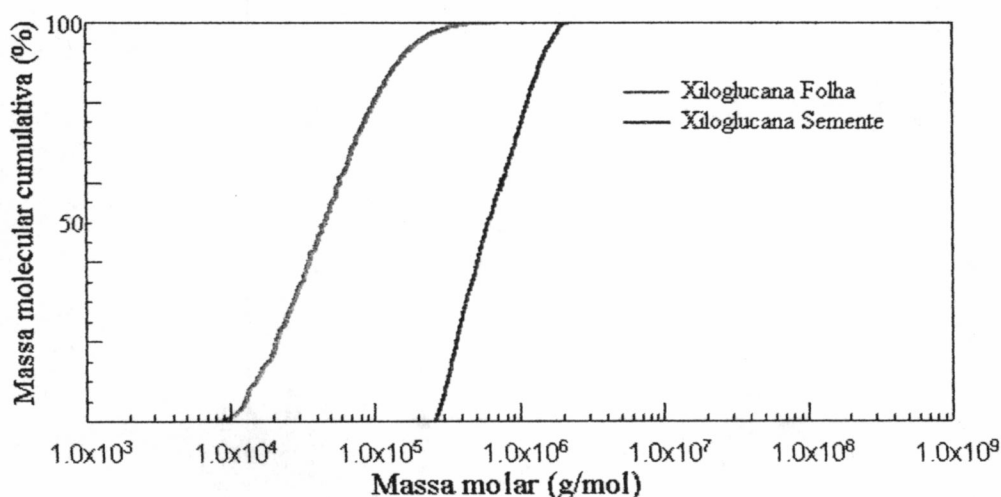


Figura 9. Distribuição de massa molecular para as xiloglucanas de folhas e sementes de *Hymenaea courbaril*.

Analisando-se a distribuição de massa molecular (Figura 9) para a xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* pode-se observar que a massa molar varia de aproximadamente 10.000 a 800.000 g/mol, sendo seu índice de polidispersão de 2,07. Já para a xiloglucana de reserva os valores de massa molar estão entre 300.000 a 2.000.000 g/mol, apresentando índice de polidispersão de 1,33, menor do que o obtido para polissacarídeo estrutural, indicando que a xiloglucana fucosilada é mais polidispersa. Esta maior polidispersão pode estar relacionada

à função estrutural do polissacarídeo e ao seu papel durante a expansão celular. Nishitani e Tominaga (1991) analisaram a massa molecular da xiloglucana de parede celular de epicótilos de *Vigna angularis* durante o tratamento com uma preparação de enzimas extraídas da parede celular destes epicótilos. Foi observado que este tratamento produz um substancial aumento de massa molecular da xiloglucana bem como a geração de fragmentos menores. Isto sugeriu um possível envolvimento de uma transglicosilase, posteriormente purificada e denominada de xiloglucana endotransglicosilase (XET) (NISHITANI e TOMINAGA, 1992; FRY et al., 1992), responsável por esta polidispersão das moléculas de xiloglucana. Nishitani e Tominaga (1992) utilizaram a xiloglucana de sementes de tamarindo, com distribuição de massa molecular definida, para analisar o efeito da XET sobre massa molecular do polissacarídeo. Após o tratamento enzimático da xiloglucana foi observado o alargamento do pico no perfil de eluição por GPC sem no entanto alterar o tempo de retenção. Estes resultados sugeriram que a XET, através da transferência de um segmento de uma molécula de xiloglucana para outra molécula de xiloglucana, causa esta polidispersão do polímero.

Entretanto, deve-se considerar que a maior polidispersão observada na xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*, quando comparada a xiloglucana das sementes, também pode ter ocorrido devido à degradação durante o processo de extração. A xiloglucana de reserva foi obtida por extração aquosa enquanto que a xiloglucana das folhas foi extraída com álcali concentrado. A possibilidade de degradação do polissacarídeo durante a extração não pode ser excluída, entretanto é pouco provável pois durante as extrações alcalinas foi adicionado NaBH_4 para evitar a hidrólise do polímero.

5.2. Caracterização das unidades de xilose 4-*O* substituídas na xiloglucana

A xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* foi previamente submetida (BUSATO, 1999) à análise de metilação de acordo com Ciucanu e Kerek (1984), sendo que os resultados obtidos confirmaram a estrutura geral das xiloglucanas de parede celular primária. Contudo, durante a etapa de redução dos monossacarídeos parcialmente metilados foi utilizado NaBH_4 , o que não permite distinguir os derivados acetatos de 2,3- Me_2 -xilitol e 3,4- Me_2 -xilitol. Para alcançar este objetivo, a xiloglucana foi novamente metilada, pelo mesmo método, mas agora utilizando NaBD_4 na etapa de redução. Os perfis de fragmentação obtidos foram comparados aos derivados identificados por Carpita e Shea (1989). GC-MS

quantitativo da mistura dos alditóis acetatos parcialmente metilados são mostrados na Tabela IV. A análise de GC-MS em coluna DB-225 resulta em sobreposição dos picos correspondentes ao 2,3,4-Me₃Fuc e 2,3,4-Me₃Xyl. Estes componentes foram separados utilizando-se coluna BD-210, e a proporção relativa de cada um foi utilizada para ajustar as porcentagens obtidas com a coluna DB-225 conforme estabelecido por Maurer-Menestrina et al. (2003). O pico correspondente ao tempo de retenção de 8,3 minutos analisado por MS está apresentado na Figura 11. Neste estão os fragmentos correspondentes à mistura de acetatos de 2,3-Me₂-xilitol e 3,4-Me₂-xilitol, que estão representados esquematicamente na Figura 10, onde estão assinalados os fragmentos obtidos por MS.

Tabela IV. Análise de metilção da xiloglucana das folhas de *Hymenaea courbaril*.

Acetatos de alditóis parcialmente metilados	Ligação indicada	% área	Tempo de retenção (min)
2,3,4-Me ₃ Xyl ^a	(Xylp)1→	15,2	6,94
2,3,4-Me ₃ Fuc ^a	(Fucp)1→	6,1	6,98
2,3,4,6-Me ₄ Glc	(Glc p)1→	2,5	8,02
2,3,4,6-Me ₄ Gal	(Galp)1→	4,9	8,15
3,4- e 2,3-Me ₂ Xyl	→2 e →4 (Xylp)1→	11,5	8,31
3,4,6-Me ₃ Gal	→2(Galp)1→	8,3	9,61
2,3,6-Me ₃ -Hexitol	-	2,2	9,83
2,3,6-Me ₃ Glc	→4(Glc p)1→	19,9	10,03
2,3-Me ₂ Glc	→4(Glc p)1→ 6 ↑	29,4	13,16

^a Estes foram separados e quantificados em coluna DB-210. Os outros acetatos de alditóis parcialmente metilados foram separados e quantificados em coluna DB-225.

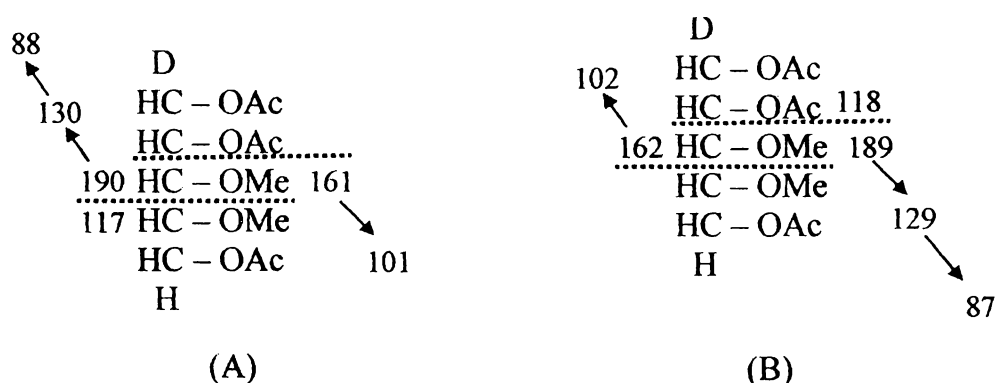


Figura 10. Representação esquemática dos acetatos de (A) 2,3-Me₂-xilitol e (B) 3,4-Me₂-xilitol, reduzidos com NaBD₄ e parcialmente acetilados.

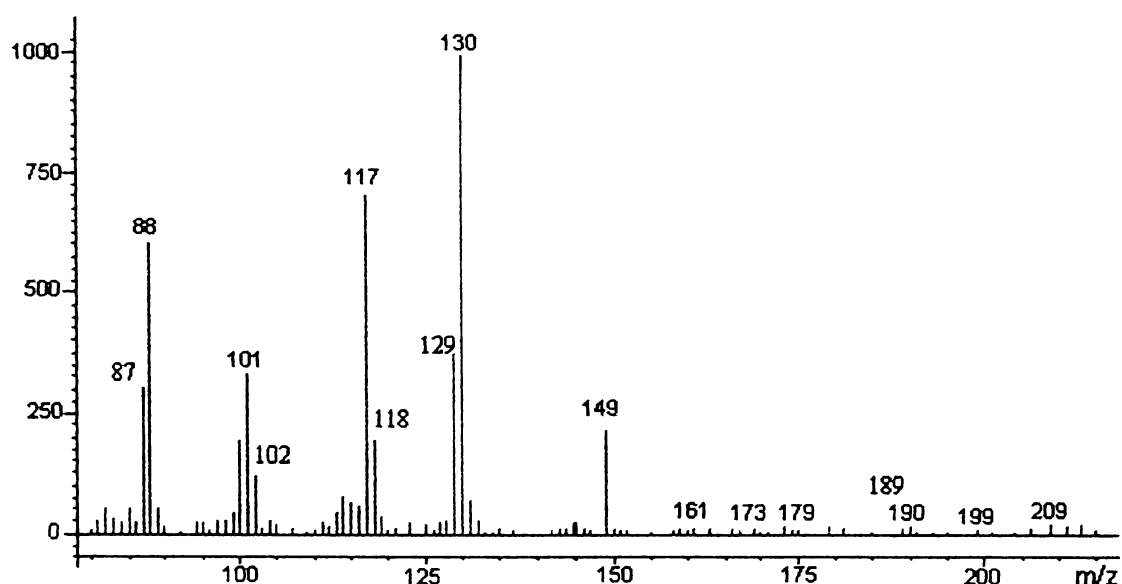


Figura 11. Espectro de GC-MS do derivado Me₂-Xilitol da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* metilada, utilizando NaBD₄ na etapa de redução dos monossacarídeos parcialmente metilados (coluna DB-225).

A presença do 3,4-Me₂-xilitol (Figura 10) foi confirmada como o principal derivado (fragmentos m/z 190, 130, 117 e 88), indicando unidades de xilose substituídas em O-2. Entretanto, os fragmentos m/z 189, 129, 118 e 87 foram também encontrados, os quais indicam algumas unidades de xilose substituídas em O-4. Nesta análise de metilação também foi identificado um pico com espectro característico do derivado 2,3,6-Me₃-hexitol, com tempo de retenção de 9,83 minutos (Tabela IV). Este derivado poderia corresponder a unidades de galactose substituídas em O-4 nesta xiloglucana. Entretanto deve-se considerar que a xiloglucana pela análise dos acetatos de alditóis (Tabela III) apresentou 2 % de manose. A presença deste monossacarídeo após a purificação de xiloglucanas já foi descrita anteriormente (O'NEILL e SELVENDRAN, 1983; REDGWELL e SELVENDRAN., 1986;

VINCKEN et al., 1994; VINCKEN et al., 1996; CUTILLAS-ITURRALDE et al., 1998). Além disso, a partir da extração aquosa das sementes de *Hymenaea courbaril*, Souza-Lima (1997) identificou uma xiloglucana de reserva, como principal componente, e a presença de galactomana, em menor proporção. O derivado metilado obtido a partir da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*, indica que a impureza apresenta ligações (1→4), correspondendo provavelmente a manana.

Para confirmar estes resultados, o polissacarídeo foi novamente metilado e então derivatizado a aldonitrilos acetilados (NOSEDA, 1994), com o objetivo de se separar os fragmentos dos derivados 3,4-Me₂-xilose e 2,3,-Me₂-xilose, conforme observado previamente por Lance e Jones (1967). Utilizando-se uma coluna capilar DB-225, estes derivados apresentaram tempos de retenção de 8,88 e 8,95 minutos respectivamente, sendo que 3,4-Me₂-xilose apresentou um pico três vezes maior do que 2,3,-Me₂-xilose. Estes resultados confirmam as proporções de 3,4-Me₂-xilose e 2,3,-Me₂-xilose no padrão de fragmentação obtido no experimento prévio. Os espectros de GC-MS dos derivados di-*O*-metil-xilose obtidos a partir da xiloglucana estão apresentados nas Figuras 12B e 13B. Estes espectros foram comparados a padrões autênticos do 3,4-Me₂-xilose (Figura 12A) e 2,3-Me₂-xilose (Figura 13A), os quais foram derivatizados da mesma forma que a amostra. Os derivados aldonitrilos acetilados parcialmente metilados obtidos a partir da xiloglucana apresentaram o mesmo padrão de fragmentação dos padrões de 3,4-Me₂-xilose (*m/z* 168, 126, 117 e 101) e 2,3,-Me₂-xilose (*m/z* 200, 129 e 87), os quais tiveram tempos de retenção de 9,00 e 9,08, respectivamente. Estes experimentos demonstram a presença de dois derivados de Me₂-xilose conforme indicado pelos resultados anteriores.

A presença destas unidades de xilose substituídas em O-4 nesta preparação homogênea da xiloglucana de *Hymenaea courbaril* não é usual. Em trabalhos anteriores, somente unidades de xilose substituídas em O-2 foram detectadas nas xiloglucanas secretadas por *Echinacea purpurea* (WAGNER et al., 1988), na de cultura de células de *Nicotiana glauca* (SIMS et al., 1996) e no fruto de *Olea europaea* (VIERHIUS et al., 2001a). Na análise de metilação dos polissacarídeos citados, utilizando-se NaBD₄, somente o derivado 3,4-Me₂Xyl foi obtido.

Buchala et al. (1993) analisaram as xiloglucanas presentes nas fibras, folhas e cultura de células de *Gossypium* sp. O polissacarídeo foi parcialmente metilado, hidrolisado e convertido a aldonitrilo acetilado. Em todas as amostras, pequenas quantidades do 2,3-di-*O*-metil-xilose foram encontradas, mas foram atribuídas a contaminação por xilanas.

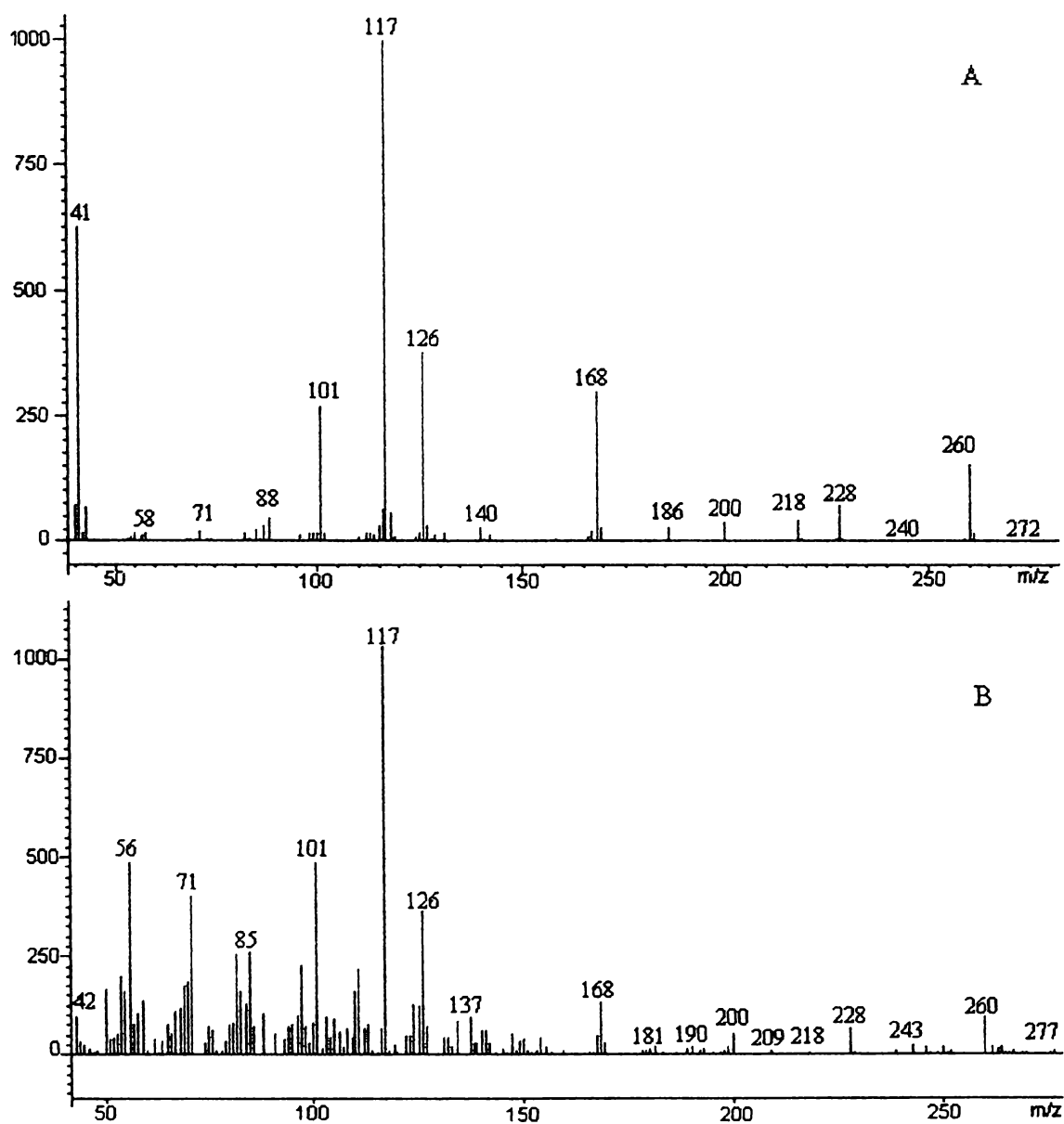


Figura 12. Espectro de GC-MS (A) padrão e (B) derivado 3,4-Me₂-xilose da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* na forma de aldonitrilos acetilados parcialmente metilados (coluna DB-225).

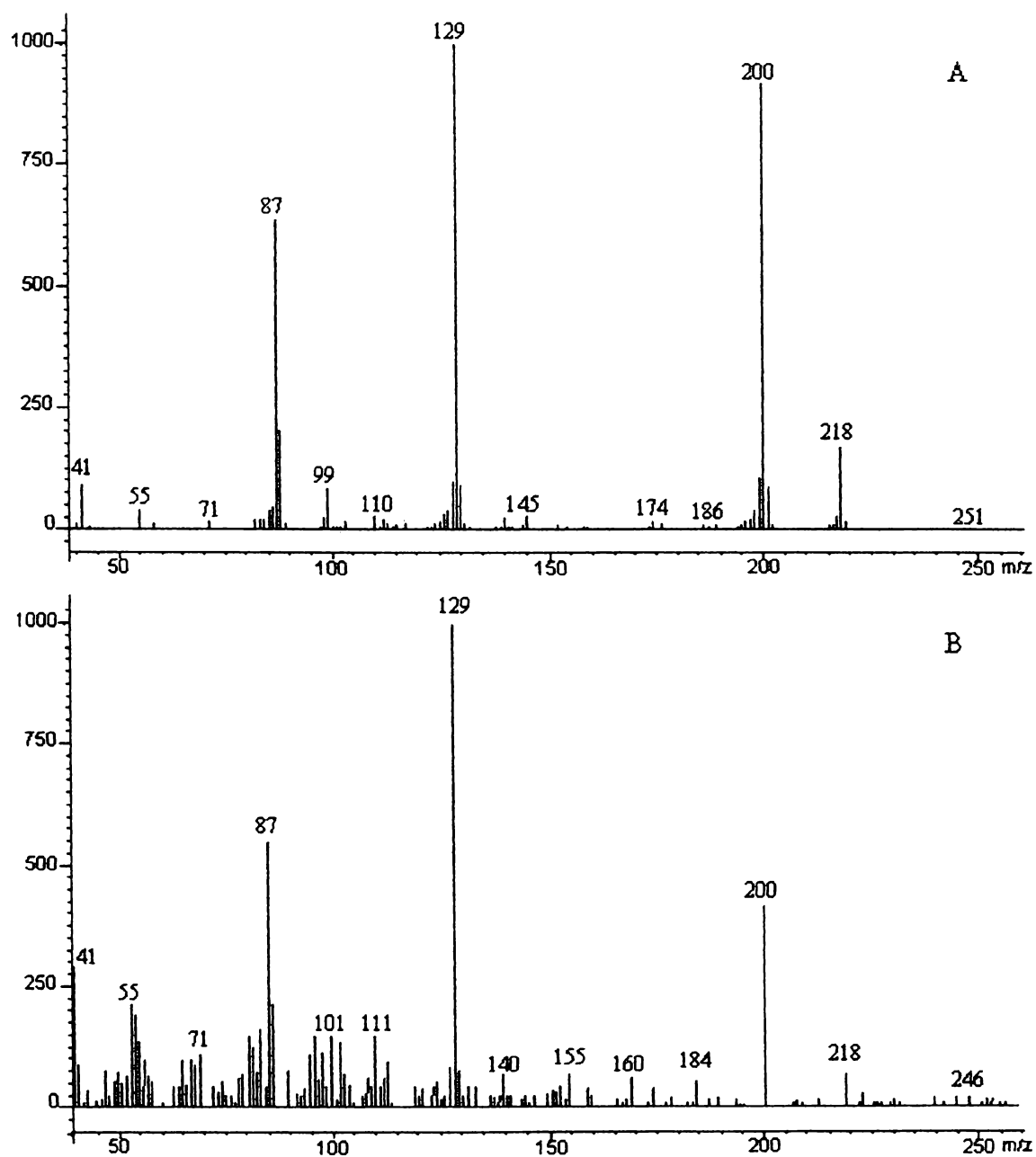


Figura 13. Espectro de GC-MS (A) padrão e (B) derivado 2,3-Me₂-xilose da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* na forma de aldônitrilos acetilados parcialmente metilados (coluna DB-225).

Em outros estudos unidades de xilose com ligação (1→4) foram identificadas sendo atribuídas a outras hemiceluloses. Um deles foi realizado por Stevens e Selvendran (1984), que analisaram o complexo arabinoxilana-xiloglucana-pectina-proteína obtido de folhas de *Brassica oleracea*, no qual obteve-se a mistura do 2,3- and 3,4-Me₂Xyl, outro foi realizado por Mabusela et al. (1990), que investigaram os polímeros de folhas de *Aloe ferox* e também obtiveram os dois derivados de Me₂Xyl. Entretanto é importante ressaltar que se tratava de material impuro. Mais recentemente Martin (2003) analisou por metilação a xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*, também utilizando NaBD₄ na etapa de redução. No espectro de GC-MS do derivado Me₂-xilitol da xiloglucana de reserva, a intensidade do fragmento 118 indica uma possível substituição em O-4 nas unidades de xilose, além da substituição em O-2 normalmente encontrada. Porém os outros fragmentos característicos do derivado 2,3-Me₂Xyl não apareceram ou apresentaram baixa intensidade.

A xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* foi examinada por espectroscopia de RMN. As proporções relativas das diferentes unidades monossacarídicas foram determinadas através da integração dos sinais da região anomérica do espectro de ¹H-RMN (Figura 14). Este espectro foi obtido em aparelho BRUKER DRX-400, com ressonância de ¹H-RMN de 400 MHz.

Os prótons anoméricos das unidades de xilose terminais, substituídas por galactose em O-2 e pela cadeia lateral α-Fucp-(1→2)-β-Galp-(1→ foram identificados a 4,930, 5,124 e 5,106 ppm, nas proporções de 1: 0,36: 0,2, respectivamente, sendo que a intensidade do sinal de H-1 da fucose é proporcional àquela obtida para a xilose substituída pelo dissacarídeo Fuc→Gal. Na região anomérica das hexoses ocorreu a sobreposição dos sinais das unidades de glucose e galactose, bem como do sinal de H-5 das unidades de fucose.

Os espectros de HMQC, Figuras 15 e 16, e de COSY, TOCSY e NOESY, Figuras 17, 18(A) e 18(B) respectivamente, também foram obtidos em aparelho BRUKER DRX-400, com ressonância de ¹³C e ¹H, de 100 e 400 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C-RMN (Tabela V), bem como motivos estruturais (Figura 21) para as cadeias laterais do polissacarídeo foram propostos (página 77), sendo que os três tipos de substituições possíveis foram denominados de 1, 2 e 3. Portanto a unidade de xilose substituída pelo dissacarídeo fucosil-galactose foi denominada de Xyl¹, a substituída por galactose de Xyl², e aquelas não substituídas de Xyl³. Esta nomenclatura foi utilizada nas Figuras 15 a 20 e na Tabela V.

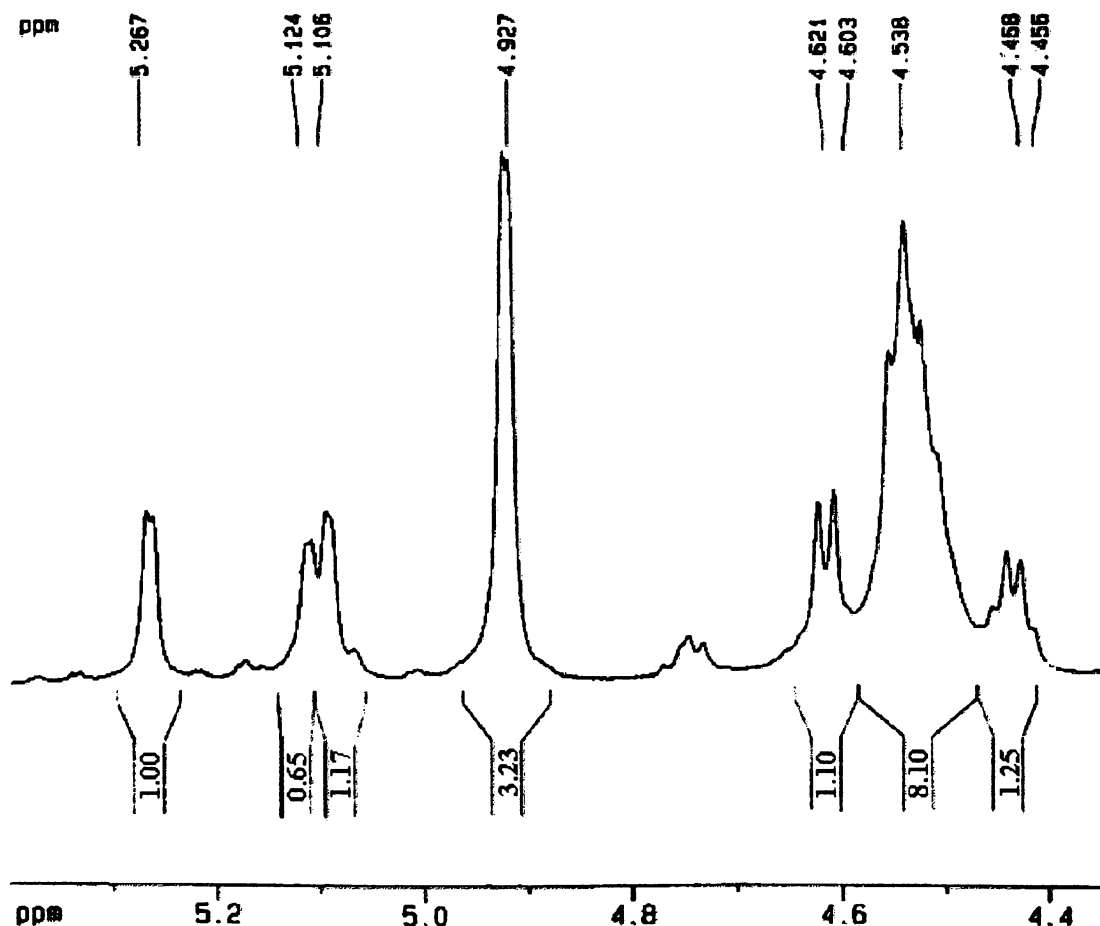


Figura 14. Integração da região anomérica do espectro de ^1H -RMN da xiloglucana fucosilada de *Hymenaea courbaril* a 20 mg/mL (D_2O , 50 °C), em aparelho BRUKER DRX-400. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

Os espectros de HMQC, Figuras 15 e 16, e de COSY, TOCSY e NOESY, Figuras 17, 18(A) e 18(B) respectivamente, também foram obtidos em aparelho BRUKER DRX-400, com ressonância de ^{13}C e ^1H , de 100 e 400 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C -RMN (Tabela V), bem como motivos estruturais (Figura 21) para as cadeias laterais do polissacarídeo foram propostos (página 77), sendo que os três tipos de substituições possíveis foram denominados de 1, 2 e 3. Portanto a unidade de xilose substituída pelo dissacarídeo fucosil-galactose foi denominada de Xyl^1 , a substituída por galactose de Xyl^2 , e aquelas não substituídas de Xyl^3 . Esta nomenclatura foi utilizada nas Figuras 15 a 20 e na Tabela V.

Embora as xiloglucanas fucosiladas vêm sendo estudadas há mais de 30 anos, atribuições completas dos sinais de RMN para o polissacarídeo não estão disponíveis na literatura. Sinais de ^1H e ^{13}C -RMN para oligossacarídeos de sementes de xiloglucana, os quais

não apresentam substituição por fucose (YORK et al., 1990; YORK et al., 1993; BRACCINI et al., 1995), e para xiloglucanas presentes nas Solanáceas (JIA et al. 2003) já foram atribuídos. Alguns autores atribuíram todos os sinais de ^1H -RMN para os oligossacarídeos fucosilados (YORK et al. 1990; SPRONK et al, 1998). Entretanto, sinais de ^{13}C -RMN para estes oligossacarídeos e para o polissacarídeo intactos são geralmente atribuídos somente para os carbonos anoméricos; alguns sinais na região a 85-60 ppm, tais como C-4 e C-6 substituídos das unidades de β -glucopiranosose, e C-6 das unidades de fucopiranosose (BUCHALA et al., 1993; WATT et al., 1999).

A partir dos sinais de H-1, H-2 e H-3 obtidos nos espectros de TOCSY (Figuras 18A e 20) foi possível atribuir os deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN para as unidades de galactose interna: C-1 (δ 103,58), C-2 (δ 77,80), C-3 (δ 73,70) e para a fucose C-1 (δ 99,77), C-2 (δ 69,07), C-3 (δ 70,15 ppm) no espectro de HMQC (Figuras 16 e 19). Os sinais de ^1H e ^{13}C -RMN das posições 4, 5 e 6 das unidades de galactose interna: C-4 (δ 70,07), C-5 (δ 75,33) e C-6 (δ 61,41); e para a fucose: C-4 (δ 72,60), C-5 (δ 67,33) e C-6 (δ 16,39 ppm) foram atribuídos através dos espectros de HMQC (Figuras 16 e 19), de acordo com os sinais atribuídos anteriormente por York et al. (1990).

Os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H -RMN atribuídos para as unidades de xilose terminal (Xyl^3) e substituídas em O-2 por galactose (Xyl^2) apresentam uma boa correlação com aqueles atribuídos para os oligossacarídeos da xiloglucana de sementes de tamarindo e da casca da semente de colza (YORK et al., 1990; YORK et al., 1993), xiloglucana de maçã e seus oligossacarídeos (WATT et al., 1999). Quanto às unidades de xilose substituídas pelo dissacarídeo fucosil-galactose (Xyl^1), os espectros de COSY, TOCSY e NOESY a 400 MHz, Figuras 17 e 18(A) e (B) respectivamente, permitiram identificar somente os deslocamentos químicos de H-1 (δ 5,106), H-2 (δ 3,630) e H-3 (δ 3,860). No espectro de HMQC (Figura 15) foi possível observar que o sinal de C-1 destas unidades, assim como o daquelas substituídas somente por galactose, também aparece a 99,14 ppm. No entanto, no espectro de COSY (Figura 17), é interessante notar a presença de dois sinais de H-1 para as unidades de α -Fucp. Estes sinais poderiam corresponder a unidades de fucose presentes em possíveis cadeias laterais constituídas por α -Fucp(1 $\rightarrow$ 2) β -Galp(1 $\rightarrow$ 2) α -Xylp-(1 $\rightarrow$ e α -Fucp(1 $\rightarrow$ 2) β -Galp(1 $\rightarrow$ 4) α -Xylp-(1 $\rightarrow$. A presença de dois sinais poderia ser justificada pela proximidade da fucose com as unidades de xilose no caso da substituição destas em O-2, o que não ocorreria com as unidades substituídas em O-4.



Figura 15. Espectro de HMQC (A) da xiloglucana fucosilada e (B) ampliação da região anomérica, a 70 mg/mL (D₂O, 70 °C), em aparelho BRUKER DRX-400. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

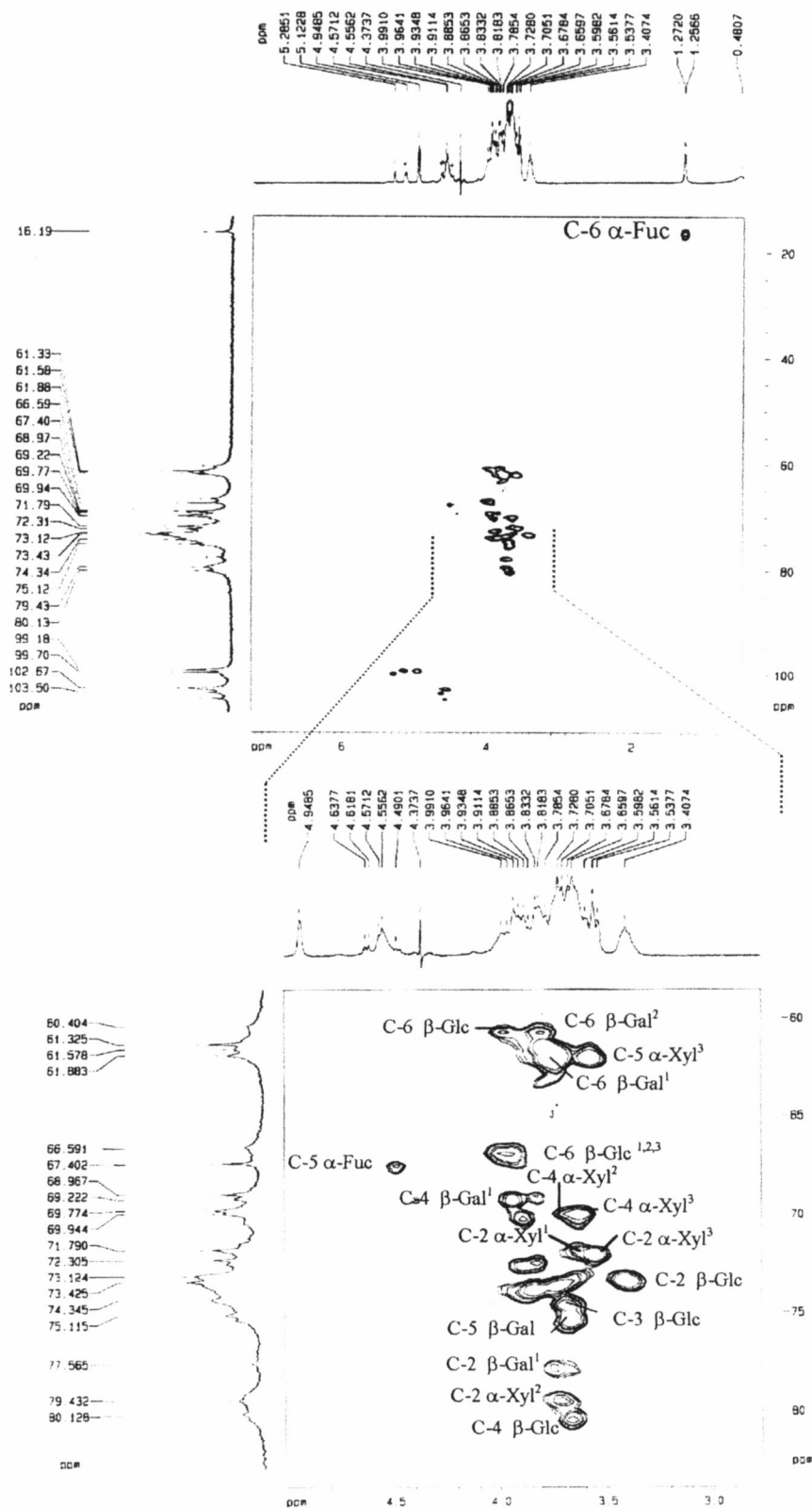


Figura 16. Espectro de HMQC (A) da xiloglucana fucosilada e (B) ampliação da região de 55 a 85 ppm, a 70 mg/mL (D_2O , 70 °C), em aparelho BRUKER DRX-400.

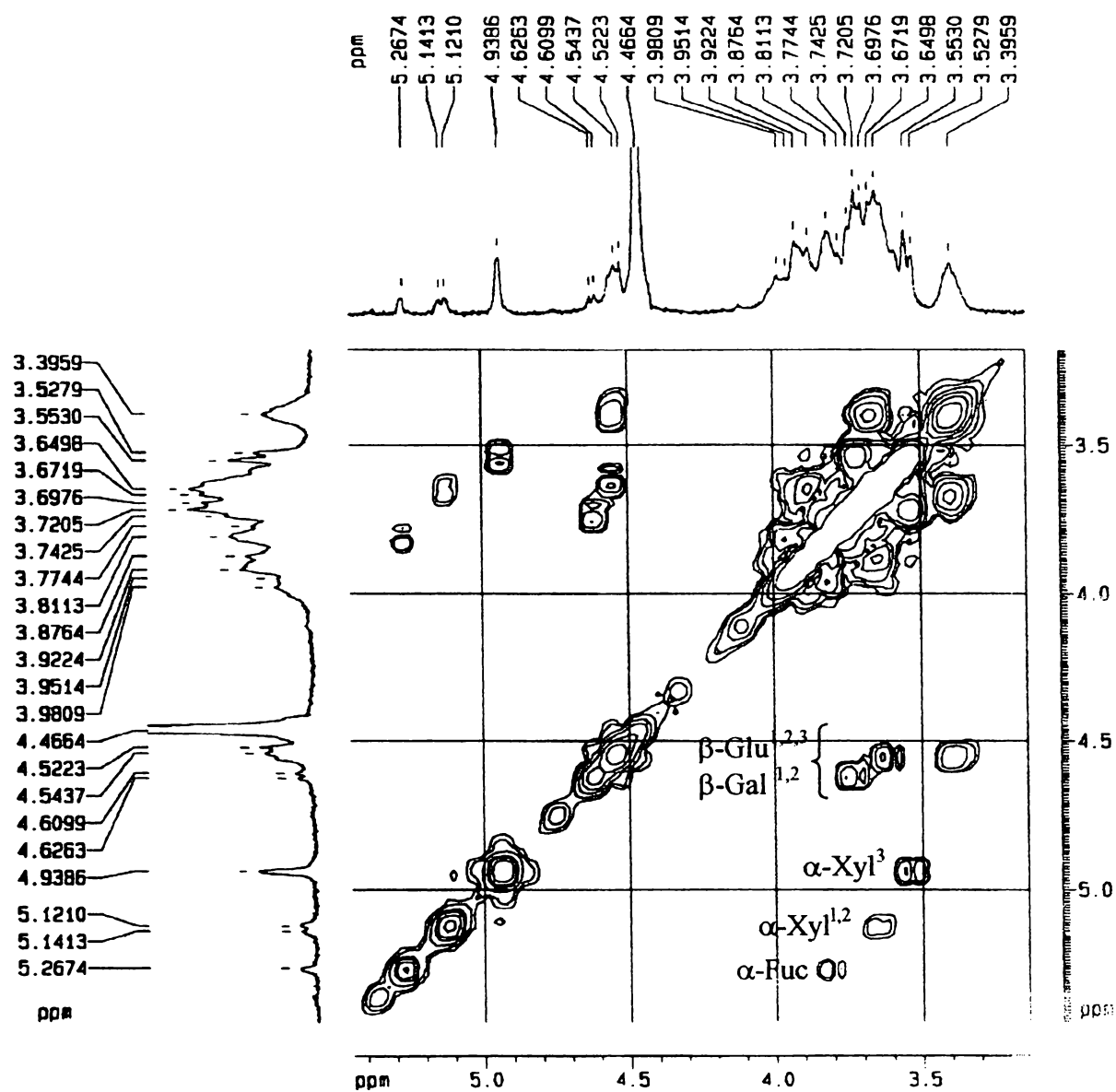
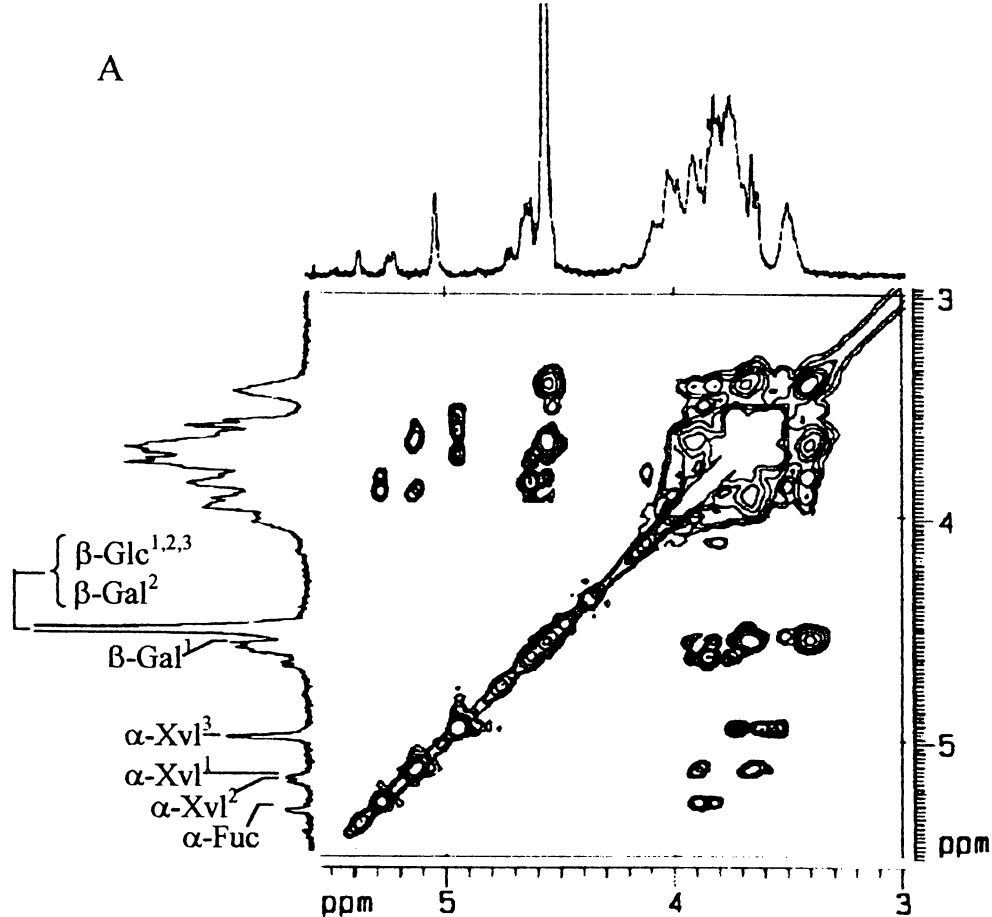


Figura 17. Espectro de COSY da xiloglucana fucosilada, a 20 mg/mL (D₂O, 50 °C) , em aparelho BRUKER DRX-400. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.



B

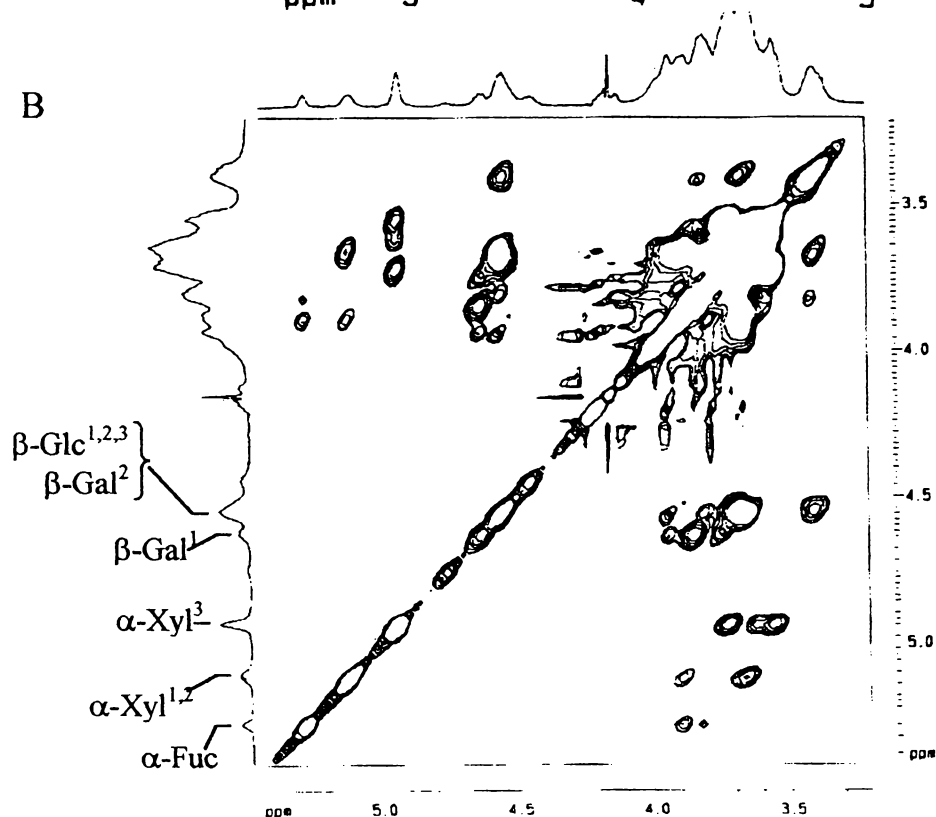


Figura 18. Espectro de (A) TOCSY e (B) NOESY da xiloglucana fucosilada, a 20 mg/mL (D_2O , 50 °C), em aparelho BRUKER DRX-400. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

No entanto, a resolução dos espectros obtidos com o aparelho BRUKER DRX-400, com ressonância de ^{13}C e ^1H , de 100 e 400 MHz respectivamente, não permitiu a atribuição do sinal de H-4 das unidades de xilose substituídas pela cadeia lateral $\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Gal}$. Para alcançar este objetivo, a xiloglucana foi analisada em aparelho BRUKER DRX-500, com ressonância de ^1H e ^{13}C de 500 e 125 MHz respectivamente, a 80 °C.

Os espectros de HMQC e TOCSY estão apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente. Na ampliação da região de 3,2 a 4,2 ppm do espectro de TOCSY, as correlações de H-1 com H-2, H-3 e H-4 das unidades de galactose interna e da xilose terminal estão bem evidentes permitindo confirmar os resultados obtidos anteriormente. As correlações dos prótons das unidades de xilose substituídas por galactose (Xyl^2) ou pelo dissacarídeo fucosil-galactose (Xyl^1) apareceram em regiões muito próximas, pois os prótons anoméricos estão a 5,124 e 5,106, respectivamente. Apesar disto, foi possível identificar os sinais de H-1 a H-4 destas unidades, como pode ser observado na Figura 19(B). O sinal a 5,124 ppm (H-1) das unidades de Xyl^2 apresenta correlação com o sinal a 3,673 (H-2), 3,728 (H-4) e 3,891 (H-3) ppm. Já H-1 (δ 5,106) das unidades de xilose substituídas pelo dissacarídeo apresenta correlação com 3,630 (H-2), 3,644 (H-4) e 3,860 (H-3) ppm. No espectro de HMQC (Figura 19) estes sinais puderam ser relacionados aos seus respectivos carbonos, podendo-se identificar os sinais de C-2, C-3 e C-4 das unidades de xilose substituídas por $\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Gal}$. A melhor resolução deste espectro de HMQC permitiu a identificação de dois sinais na região de C-4, a 80,65 e 80,43 ppm, que apresentaram correlação com H-4 das unidades de $\text{Glc}^{1,2,3}$ e de Xyl^1 , respectivamente. O sinal de 73,88 ppm apresentou correlação com o sinal de próton a δ 3,630. No experimento de TOCSY (Figura 20), este sinal foi atribuído ao H-2 das unidades de xilose ligadas ao dissacarídeo fucosil-galactose. Já o sinal a 80,30 ppm (Figura 19) apresentou correlação com H-2 das unidades de Xyl^2 (δ 3,673), enquanto que os sinais de C-4 (H-4) destas unidades aparecem em 70,12 (3,728) ppm, respectivamente.

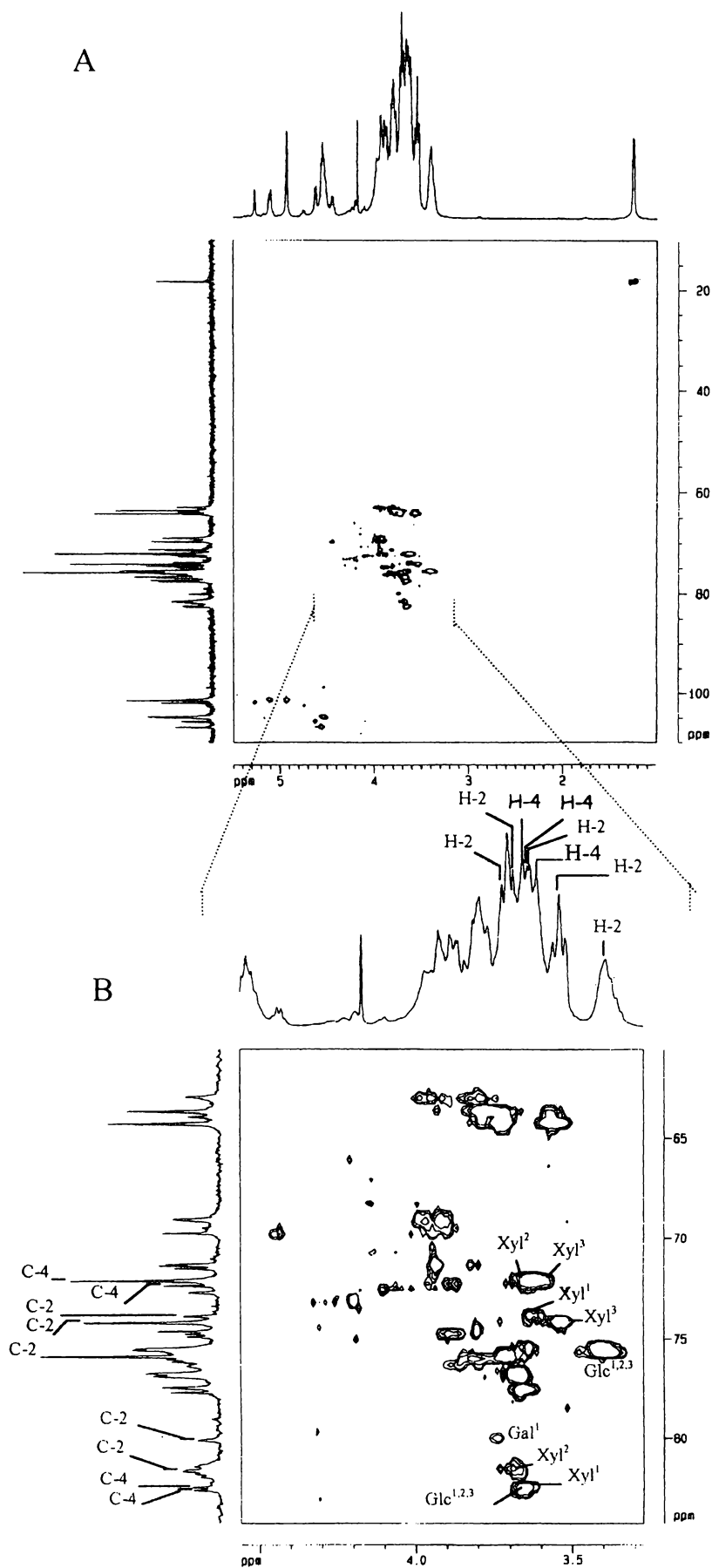


Figura 19. Espectro de HMQC da (A) xiloglucana fucosilada e (B) ampliação da região de 60 a 85 ppm, a 80 mg/mL (D_2O , 80 °C), em aparelho BRUKER DRK 500.

Tabela V. Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H -RMN da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*.

Unidade	C-1 (H-1)	C-2 (H-2)	C-3 (H-3)	C-4 (H-4)	C-5 (H-5)	C-6 (H-6)
β -Glc ^{1,2,3}	102,71 (4,538)	73,37 (3,402)	75,27 (3,66)	80,65 (3,646)	73,74 (3,825)	66,98 (3,969)
α -Xyl ³	99,16 (4,930)	72,5 (3,543)	73,56 (3,722)	69,9 (3,617)	62,16 (3,563)	- -
α -Xyl ²	99,14 (5,124)	80,3 (3,728)	72,45 (3,891)	70,12 (3, 673)	61,73 (3,557)	- -
α -Xyl ¹	99,14 (5,106)	73,88 (3,630)	72,39 (3,860)	80,43 (3,644)	61,73 (3,540)	- -
β -Gal ²	104,84 (4,543)	71,9 (3,59)	73,4 (3,639)	69,27 (3,927)	76,9 (3,627)	60,52 (3,734)
β -Gal ¹	103,58 (4,621)	77,8 (3,728)	73,7 (3,824)	70,07 (3,909)	75,33 (3,653)	61,41 (3,763)
α -Fuc	99,77 (5,26)	69,07 (3,82)	70,15 (3,88)	72,6 (3,904)	67,33 (4,533)	16,39 (1,257)

(n.d.): não determinado

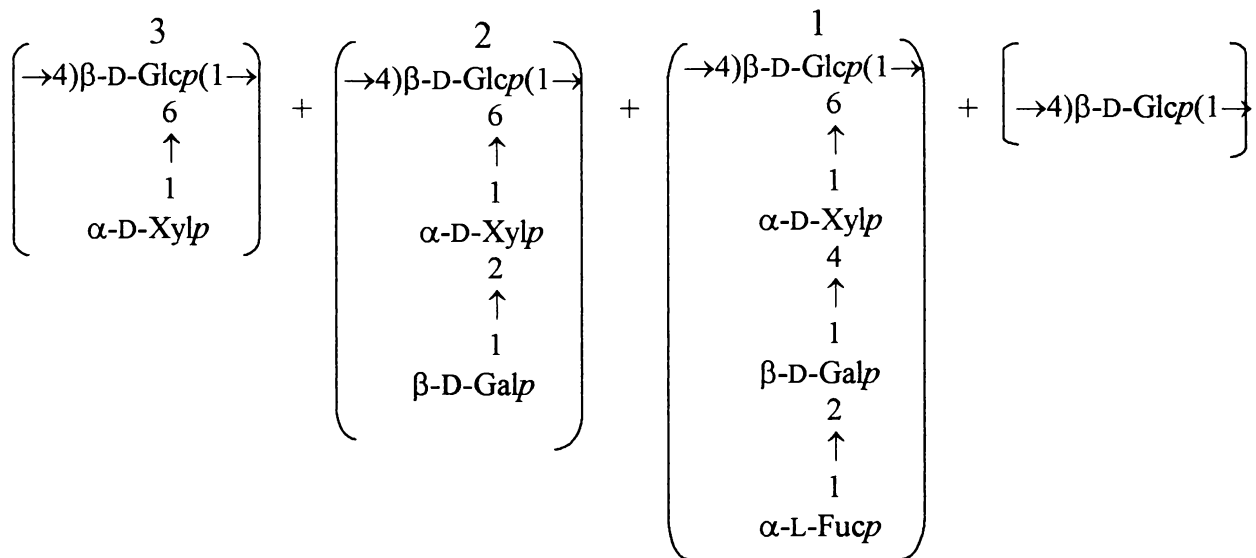


Figura 21. Motivos estruturais da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*. Os números 1, 2 e 3 indicam a substituição da cadeia lateral.

Estes resultados indicam que as unidades de Xyl² apresentam a substituição em O-2, como observado em outras xiloglucanas de reserva e estruturais (YORK et al, 1990; 1993). No entanto, as correlações obtidas nestes espectros de COSY e TOCSY sugerem uma substituição diferente daquela normalmente encontrada, para as unidades de Xyl¹ na xiloglucana estrutural de *Hymenaea courbaril*. Os resultados de RMN indicam que a substituição das unidades de xilose em O-4, identificada primeiramente por análise de metilação, deve estar presente somente nas unidades de xilose substituídas pelo dissacarídeo Fuc→Gal.

Além disso, a melhor resolução dos sinais que aparecem na região em torno de 60 ppm no espectro de HMQC (Figura 19), com ressonância de ¹³C a 500 MHz, permitiu a identificação do sinal de C-6 (H-6) das unidades de glucose não substituídas a 60,49 (3,965) ppm, e do sinal de C-5 (H-5) das unidades de Xyl¹ a 61,73 (3,540) ppm. A melhor definição obtida neste espectro também confirmou as atribuições dos outros sinais que aparecem nesta região, C-5 (H-5) das unidades de Xyl¹ e Xyl² e C-6 (H-6) das unidades de Gal¹ e Gal², que já haviam sido definidos por HMQC a 400 MHz.

Considerando os resultados de análise de metilação e RMN, a estrutura da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* apresenta uma estrutura inédita, substituída em O-2 e O-4. Estas substituições parecem ser específicas para uma determinada posição e/ou cadeia lateral das unidades de xilose. A presença de unidades de xilose substituídas em O-4, indica uma nova galactosil transferase participando da biossíntese da xiloglucana.

Apesar da genética e da bioquímica da fucosilação da xiloglucana estarem razoavelmente compreendida, a adição das unidades de galactose e xilose, bem como a síntese da β-D-glucana da cadeia principal não está completamente esclarecida (REITER, 2002). O gene MUR3 da mutante *mur3* de *Arabidopsis* foi clonado, sendo que ficou demonstrado que o mesmo codifica a enzima xiloglucana galactosiltransferase que age especificamente na segunda unidade de xilose do oligossacarídeo XXXG (MADSON et al., 2003). Este resultado reforça a hipótese de diferentes galactosil transferases, específicas para uma determinada unidade de xilose, participando da biossíntese das xiloglucanas.

5.3. Obtenção e caracterização dos oligossacarídeos

5.3.1. Hidrólise enzimática

Várias enzimas que atuam sobre a xiloglucana na parede celular primária foram identificadas e ao menos parcialmente caracterizadas (MARRY et al., 2003). Por exemplo, endoglucanases (EGs) (VERMA et al., 1975) xiloglucana endotransglicosilases (XETs) (XETs) (FRY et al., 1992) e exoglicosidases (AUGUR et al., 1995), sendo todas altamente reguladas durante o crescimento das células vegetais. Para a obtenção *in vitro* de oligossacarídeos de xiloglucana é realizada a hidrólise com endo-(1→4)-β-D-glucanase obtidas de fungos (YORK et al., 1993; HISAMATSU et al., 1991, 1992; GUILLÉN et al., 1995).

A xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* (fração XG) foi submetida à hidrólise enzimática com endo-xiloglucanase II de *A. aculeata* (XG5), e celulase de *Trichoderma viride* (EG), sendo os hidrolisados chamados de H_{XG} e H_{XG'}, respectivamente. A fração H_{XG'} foi submetida à incubação por 24 horas a 30 °C. A fração H_{XG} foi obtida por hidrólise a 37 °C, sendo monitorada quanto ao tempo de hidrólise. Conforme apresentado na Figura 22, com apenas 1 hora foi obtida a hidrólise máxima, sendo que após 5 horas de incubação, a adição de mais enzima não alterou a concentração de açúcar redutor da fração H_{XG}.

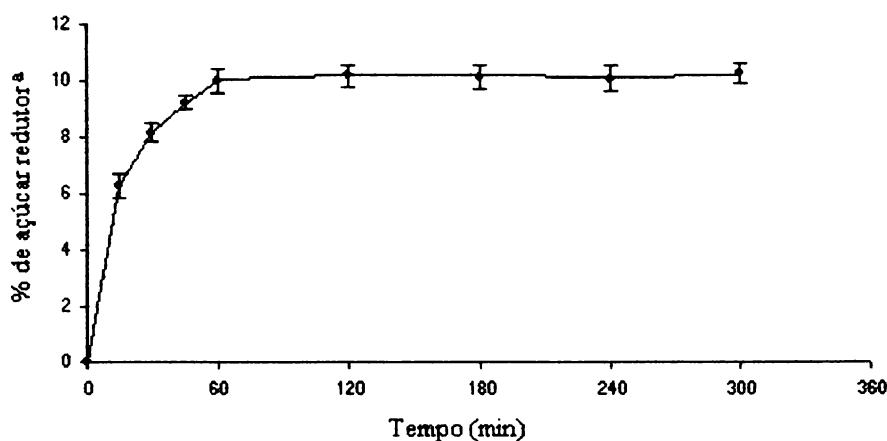


Figura 22. Curva de hidrólise da fração H_{XG}. (a): dosagem de açúcar redutor pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945).

Vários trabalhos descreveram hidrólise enzimática para a obtenção de oligossacarídeos derivados de xiloglucanas, através da ação de celulasas obtidas geralmente de *Trichoderma viride* ou *Trichoderma reesei*, sendo utilizados tempos e temperaturas de hidrólise bem diferentes. A xiloglucana de maçã, hidrolisada com endo-(1→4)-β-D-glucanase de *Trichoderma viride*, foi incubada com a enzima a 37 °C durante 24 h (RENARD, LOMAX e BOON, 1992), e a 20 °C por 4 horas (WATT et al., 1999). Os oligossacarídeos derivados da xiloglucana de parede celular de *Phaseolus coccineus* foram obtidos por hidrólise com a celulase de *Trichoderma viride*, durante 24 horas a 37 °C (O'NEILL e SELVENDRAN, 1985). Já o polissacarídeo de cultura de células de *Acer pseudoplatanus* foi hidrolisado a 20 °C por 3 horas utilizando celulase de *Trichoderma viride* (BRACCINI et al., 1995) e a 40 °C por 12 horas com a mesma enzima obtida de *Trichoderma reesei* (YORK et al., 1995). Esta enzima foi utilizada para a hidrólise do polissacarídeo das sementes de tamarindo, com tempo de incubação maior, 96 horas a temperatura ambiente (YORK et al., 1993). Marry et al. (2003) hidrolisou esta xiloglucana de reserva com endo-(1→4)-β-D-glucanase de *Pyrococcus furiosus*, sendo que o tempo de incubação foi menor, de 1 a 4 horas, mas a temperatura mais alta (50 °C). Xiloglucanas de Solanáceas, obtidas de cultura de células de *Nicotiana tabacum* e *Lycopersicon esculentum* foram incubadas com endo-(1→4)-β-D-glucanase, durante 48 horas a temperatura ambiente (YORK et al., 1996).

4.3.2. Cromatografia analítica

As frações H_{XG} e H_{XG}' foram analisadas por HPAEC-PAD sendo os resultados apresentados na Figura 23 e na Tabela VI. Os oligossacarídeos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões autênticos. A cromatografia por HPAEC-PAD de oligossacarídeos de xiloglucana gerados por endoglucanases, consiste em um método de identificação rápido (KONISHI, MITSUISHI e KATO, 1998) e altamente reprodutível (LEROUXEL et al., 2002). Além disso permite a separação de oligossacarídeos estreitamente relacionados, tais como os isômeros de posição XLXG e XXLG (LEROUXEL et al., 2002).

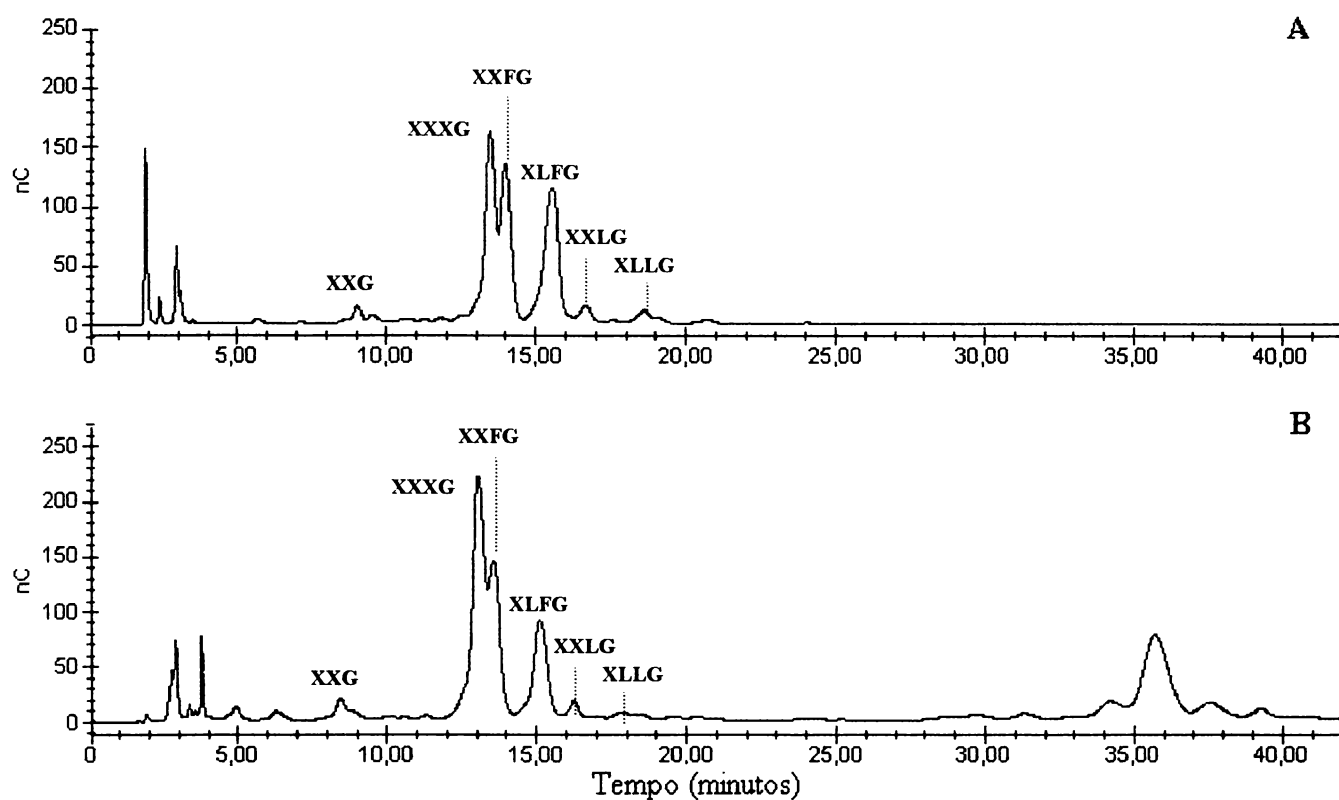


Figura 23. Perfil de eluição das frações (A) H_{XG} e (B) H_{XG}' por HPAEC-PAD (frações hidrolisadas com as enzimas XG5 e EG, respectivamente).

Tabela VI. Proporção dos oligossacarídeos obtidos através de hidrólise enzimática da xilogucana de folhas de *Hymenaea courbaril* e quantificados por HPAEC-PAD.

Oligossacarídeo	% da área dos picos	
	H_{XG}^a	$H_{XG}'^b$
XXG	2,9	3,7
XXXG	33,0	46,3
XXFG	25,6	25,1
XLFG	32,5	21,4
XXLG	3,2	2,3
XLLG	2,8	1,2

^{a,b} Frações obtidas por hidrólise com as enzimas XG5 e EG, respectivamente.

Pode-se observar na Figura 23 e na Tabela VI que as duas frações H_{XG} e H_{XG}' apresentaram perfil de eluição bastante semelhante, com exceção da proporção do XXXG que foi maior na fração H_{XG}' e do XLFG que foi maior na fração H_{XG} , o que poderia sugerir uma possível contaminação da endoglucanase de *Trichoderma viride* com β -galactosidase. É interessante notar que as proporções do oligossacarídeo XXFG não foram alteradas, o que poderia indicar que a presença da fucose impediria a ação da β -galactosidase. No entanto, York et al. (1993) observaram que as unidades de galactose na posição **a** (ver página 20) dos oligossacarídeos XLLG e XLXG de sementes de tamarindo, quando tratados com β -galactosidase secretada por *Aspergillus niger*, não foram removidas. Já as unidades de galactose na posição **b** dos oligossacarídeos XLLG e XLXG de sementes de tamarindo foram retiradas, sugerindo que a enzima não hidrolisa a ligação glicosídica das unidades de galactose na posição **a** independentemente da presença de fucose. No entanto, diferenças nas proporções de oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise de xiloglucanas, com diferentes enzimas, já foram observadas anteriormente. Vargas-Rechia (1998) hidrolisou a xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*, com *endo*- β (1 $\rightarrow$ 4)glucanase de *Humicola insolens* e *endo*-xiloglucanase de *A. aculeata*, obtendo como principais oligossacarídeos o XLXG (93,8 e 55,6 %) e o XXXG (4,7 e 39,9 %), respectivamente.

Apesar da cromatografia por HPEAC-PAD permitir a separação dos oligossacarídeos XLXG e XLFG, trabalhos anteriores observaram a contaminação do oligossacarídeo XLFG com um destes isômeros. Konishi, Mitsuishi e Kato (1998) analisaram os oligossacarídeos obtidos de xiloglucana de soja e de feijão mungo por HPAEC-PAD, utilizando coluna CARBOPAK PA-1 (DIONEX), e observaram que os oligossacarídeos XLFG e XLXG apresentaram o mesmo tempo de retenção. Lerouxel et al. (2002) analisando os oligossacarídeos derivados do polissacarídeo de folhas de mutantes de *Arabidopsis*, nas mesmas condições citadas anteriormente, obtiveram o XLFG contaminado, mas com o outro isômero, o XLFG. Já Desveaux, Faik e MacLachlan (1998) obtiveram uma boa resolução destes oligossacarídeos obtidos da xiloglucana de frutos de *Tropaeolum majus*.

Na Figura 23 pode-se observar picos com tempos de retenção entre 30 a 40 minutos presentes somente na fração H_{XG}' . Esta fração foi submetida a um maior tempo de hidrólise, durante 36, 60 e 84 horas, adicionando-se mais enzima, sendo que estes picos entre 30 a 40 minutos permaneceram, conforme pode ser observado na Figura 24.

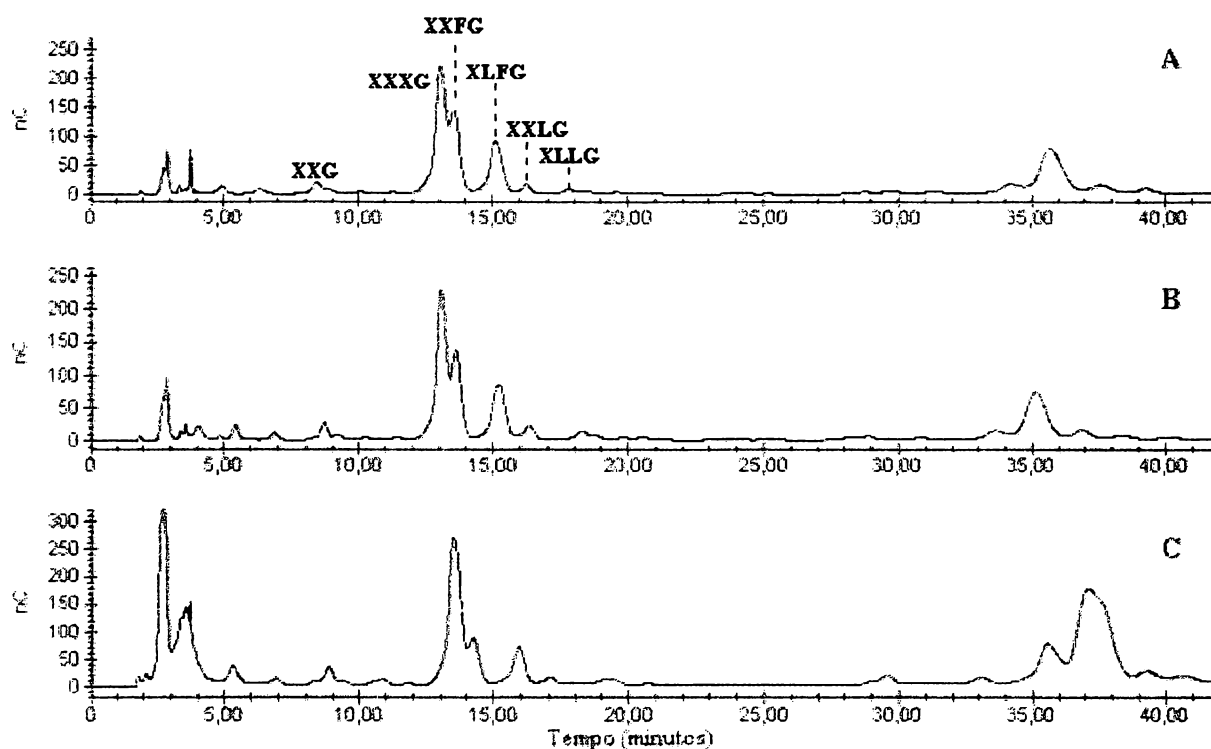


Figura 24. Perfil de eluição da fração H_{XG}' por HPAEC-PAD, submetida a 36 (A), 60 (B) e 84 (C) horas de hidrólise.

Tiné (2002) analisando os oligossacarídeos da xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*, por HPAEC-PAD nas mesmas condições, também observou picos entre 30 a 40 minutos. Nesta fração analisada por ESI-MS, foi observado a presença de dímeros dos oligossacarídeos, tais como XXLGXLLG.

Vargas-Rechia et al. (1998) hidrolisaram a xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* com endo-xiloglucanase (XG5) de *A. aculeata*. Os principais oligossacarídeos obtidos foram o XXXG e o XXLG caracterizados por análise de ^1H -RMN e FAB-MS. Buckeridge et al (1997) hidrolisaram a xiloglucana de sementes desta mesma espécie com endoglucanase (EG) de *Trichoderma viride*. Por análise de HPAEC-PAD foram identificados os oligossacarídeos XXXG, XLXG, XXLG e XLLG. Além disso, utilizando um processo de degradação enzimática sequencial, análise de HPAEC-PAD e TLC foi observado, além dos blocos constitutivos XXXG, característicos de dicotiledôneas, a presença de blocos XXXXG.

É interessante notar que na xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* analisada por HPAEC-PAD nas mesmas condições descritas por Buckeridge et al (1997), não foram identificados estes oligossacarídeos constituídos por cinco unidades de glucose na cadeia principal, indicando que o processo de biossíntese das duas xiloglucanas apresenta outras

diferenças além da fucosilação.

Lima e Buckeridge (2001) analisaram o índice de distribuição da galactose nos motivos estruturais “XL” e “LG”, expresso pela relação $(XLLG + XLXG) / (XLLG + XXLG)$ de xiloglucanas de sementes de diferentes espécies. Para a xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* foi obtido o menor índice, correspondendo a 0,2, indicando uma proporção cinco vezes maior de unidades de galactose na posição **a** (ver página 20). As xiloglucanas de *T. indica*, *T. majus* e *C. langsdorffi* apresentaram índice de 0,65, 0,75 e 0,92, respectivamente.

Calculando-se o índice de distribuição de galactose para a xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*, através da relação $(XLLG + XLFG) / (XLLG + XXLG + XXFG + XLFG)$ foram obtidos os valores de 0,55 e 0,45 para as frações H_{XG-1} e H_{XG-1}' , respectivamente. O resultado mais baixo obtido para a fração H_{XG}' deve-se provavelmente a contaminação da enzima com β -galactosidase. Na fração H_{XG} a proporção de galactose nas posições **a** e **b** é praticamente a mesma.

A espécie mutante de *Arabidopsis* *mur3* apresenta xiloglucana bastante alterada devido a ausência da cadeia lateral α -L-fucosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactose e excessiva galactosilação. Madson et al. (2003) clonaram o gene *MUR3* e verificaram que este codifica uma xiloglucana galactosiltransferase que age especificamente nas unidades de xilose na posição **b**, o que sugere a existência de duas galactosiltransferases envolvidas na biossíntese das xiloglucanas, específicas para as posições **a** ou **b**. Nas folhas de *Hymenaea courbaril* a galactosiltransferase que adiciona unidades de galactose na posição **a**, estaria menos ativa do que aquela presente nas sementes desta mesma espécie.

Analisando-se a fração H_{XG} (Tabela VI) pode-se observar que os oligossacarídeos XXXG, XLFG e XXFG correspondem a 90% do polissacarídeo, estando em proporção de 1,3: 1,3: 1,0, respectivamente. A alta proporção do oligossacarídeo XLFG, praticamente idêntica a do XXXG, encontrada na xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*, difere do esperado para xiloglucanas de parede celular primária do tipo I, em que os oligossacarídeos XXXG e XXFG são preponderantes (BAUER et al., 1973; HAYASHI, WONG e MACLACHLAN, 1984; GUILLÉN et al., 1995).

As frações H_{XG} e H_{XG}' foram analisadas por ESI-MS (Figuras 25 e 26, respectivamente).

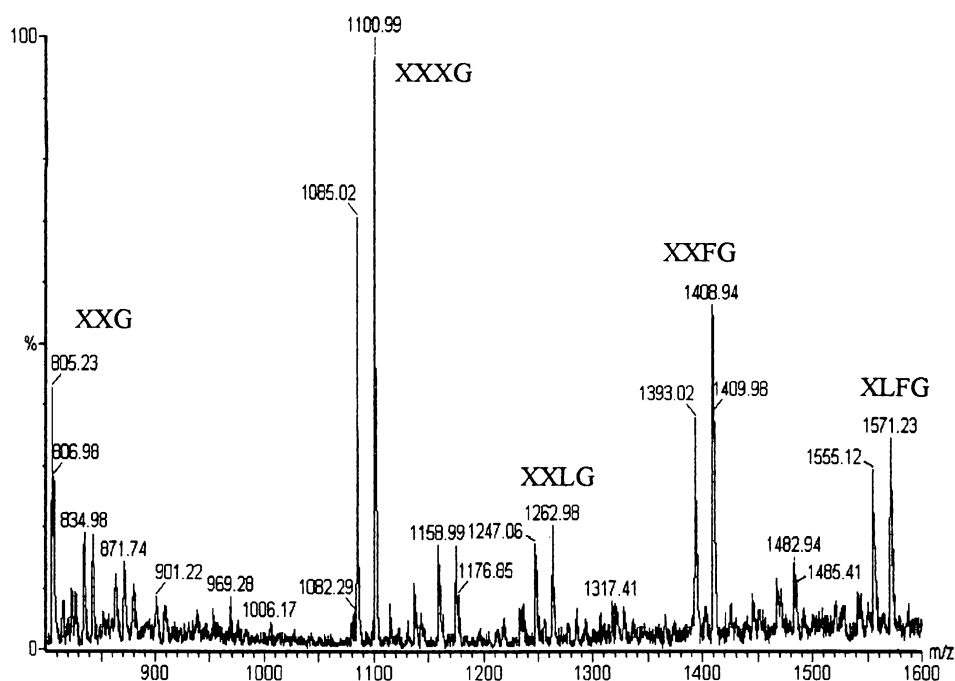


Figura 25. Espectro de ESI-MS da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* submetida a hidrólise enzimática (fração H_{XG}) com XG5 (modo positivo).

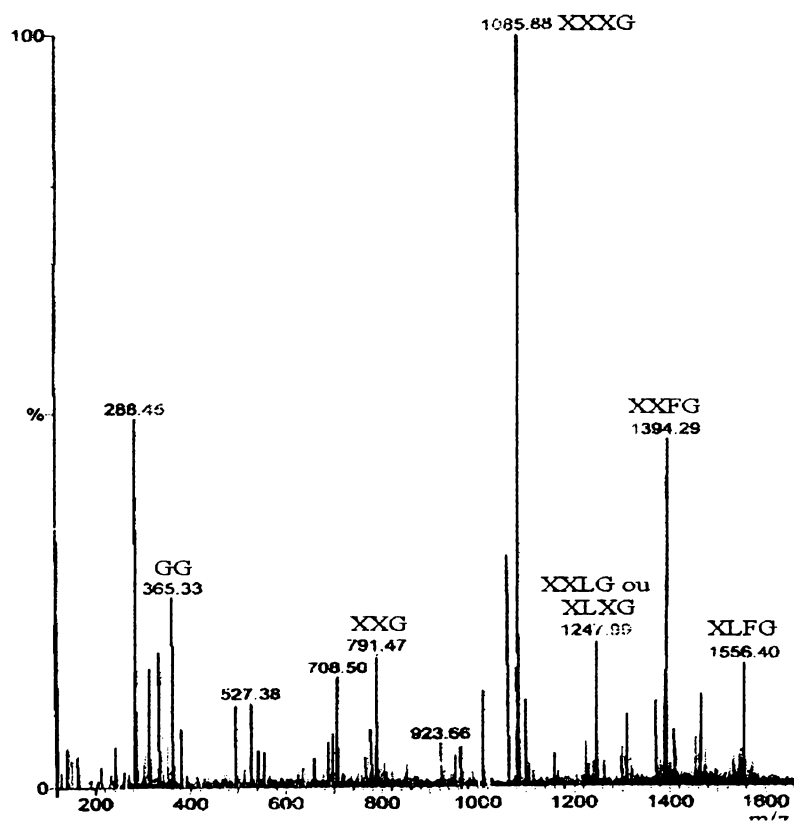


Figura 26. Espectro de ESI-MS da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* submetida a hidrólise enzimática (fração H_{XG}') com EG (modo positivo).

Tabela VII. Proporção dos oligossacarídeos obtidos através de hidrólise da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* e quantificados por ESI-MS.

Oligossacarídeo	% da área dos picos	
	H _{XG} ^a	H _{XG} ^b
XXG	16,4	8,9
XXXG	47,0	49,8
XXLG	8,3	9,8
XXFG	19,0	23,0
XLFG	9,3	8,5

^{a,b} Frações obtidas por hidrólise com as enzimas XG5 e EG, respectivamente.

No espectro de ESI-MS do hidrolisado H_{XG} (Figura 25) foram identificados os íons moleculares m/z 806 (M+Na)⁺, 1085 (M+Na)⁺, 1246 (M+Na)⁺, 1393 (M+Na)⁺ e 1555 (M+Na)⁺, correspondentes ao pentassacarídeo XXG, heptassacarídeo XXXG, octassacarídeo XXLG, nonassacarídeo XXFG e ao decassacarídeo XLFG, respectivamente. Os íons moleculares m/z 1101, 1263, 1409, 1571 correspondem a (M+K)⁺. Huisman et al. (2000) analisando os oligossacarídeos obtidos de xiloglucana de *Glycine max* por MALDI-TOF, também obtiveram 2 sinais para cada oligossacarídeo, correspondentes a (M+Na)⁺ e (M+K)⁺. Devido à presença de picos excedentes no hidrolisado H_{XG}, quando cromatografado por HPAEC-PAD, esta fração foi analisada por ESI-MS até 3000 m/z , sendo que não foram encontrados os dímeros de oligossacarídeos identificados na xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* (Tiné, 2002). Os mesmos oligossacarídeos observados na fração H_{XG} foram identificados na fração H_{XG}' (Figura 23), sendo ainda observado nesta amostra o dissacarídeo GG, provavelmente resultante da fragmentação dos oligossacarídeos.

As proporções dos oligossacarídeos XXG e XXXG na fração H_{XG} (16,4 e 47,0 %, respectivamente) analisados por ESI-MS (Tabela VII) são significativamente maiores do que as obtidas para os mesmos oligossacarídeos baseando-se na área dos picos obtidos por HPAEC-PAD, XXG (2,9 %) e XXXG (33,0 %) (Tabela VI). As diferenças nas proporções relativas obtidas nos dois métodos pode ser atribuída a fragmentação dos oligossacarídeos quando analisados por ESI-MS. A diminuição da proporção dos oligossacarídeos XXFG (19,0 %) e XLFG (9,3 %) analisados por ESI-MS (Tabela VII) quando comparada àquelas obtidas

por HPAEC-PAD, 25,6 e 32,5 %, respectivamente, bem como o aumento nas proporções relativas do XXG e XXXG, sugerem que as unidades de galactose e fucose sejam mais lábeis a fragmentação.

5.3.3. Cromatografia semi-preparativa

O hidrolisado H_{XG} foi aplicado em coluna de Biogel P-2 e eluído com água (Figura 27), obtendo-se os picos H_{XG-1} , H_{XG-2} , H_{XG-3} e H_{XG-4} . As frações oligossacarídicas H_{XG-2} , H_{XG-3} e H_{XG-4} foram analisadas por ESI-MS, Figuras, 33, 40 e 48, respectivamente. Os picos H_{XG-2} e H_{XG-3} , correspondem as frações de oligossacarídeos que foram melhor resolvidos por HPLC.

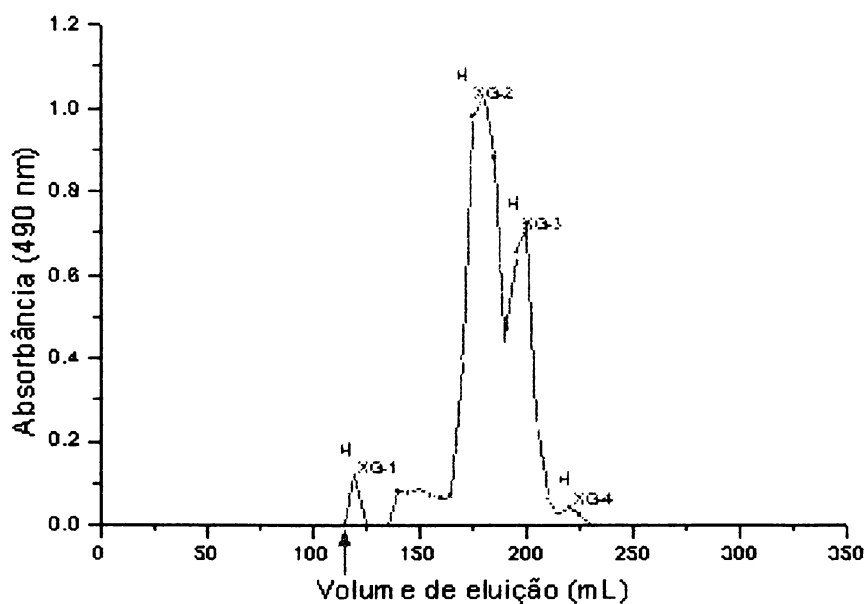


Figura 27. Perfil de eluição da xiloglucana de folhas de *H. courbaril* hidrolisada enzimaticamente (fração H_{XG}) em BioGel P-2 a 50 °C. ↑, volume morto.

5.3.3.1. Fração oligossacarídica H_{XG-1}

O pico H_{XG-1} , eluído no volume morto da coluna, corresponde a uma porção do polissacarídeo não totalmente hidrolisada, e representa aproximadamente 1,5% do material que foi eluído da coluna. A xiloglucana presente nas sementes de *Hymenaea courbaril* foi anteriormente tratada com a mesma enzima e fracionada por BioGel P-2 (VARGAS-RECHIA et al., 1998). Da mesma forma ocorrida com o polissacarídeo da folha, foi obtida uma fração não completamente hidrolisada. Com o objetivo de se comparar à ação da enzima nos dois polissacarídeos, estas duas frações foram analisadas por HPSEC. O valor de dn/dc e as massas

moleculares (M_w) dos polissacarídeos originais foram determinados, sendo 0,149 e 747.300 para a xiloglucana das sementes e 0,172 e 49.500 para a xiloglucana das folhas. É importante ressaltar as diferenças estruturais fundamentais entre os dois polissacarídeos: massa molecular e presença de fucose na xiloglucana das folhas.

Os perfis de eluição dos polissacarídeos originais e das frações H_{XG-1} obtidas das folhas e das sementes de *Hymenaea courbaril* estão apresentados nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

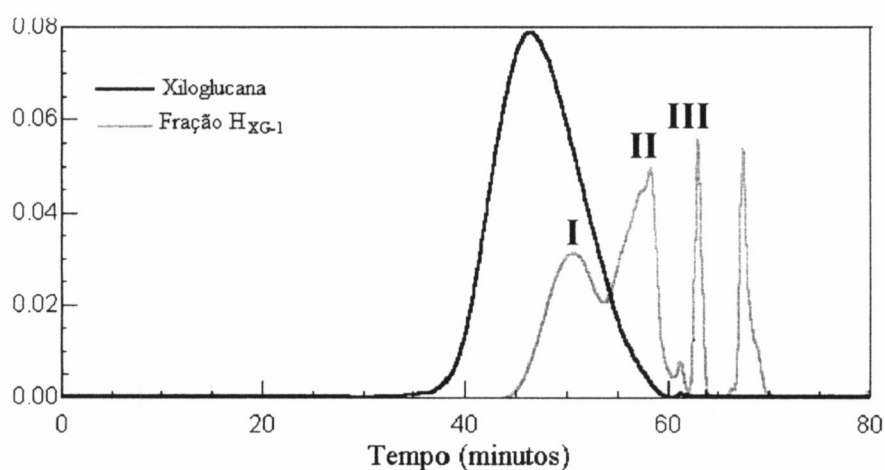


Figura 28. Perfil de eluição da xiloglucana e fração H_{XG-1} obtida das folhas de *Hymenaea courbaril*, através de HPSEC utilizando-se o detector de índice de refração.

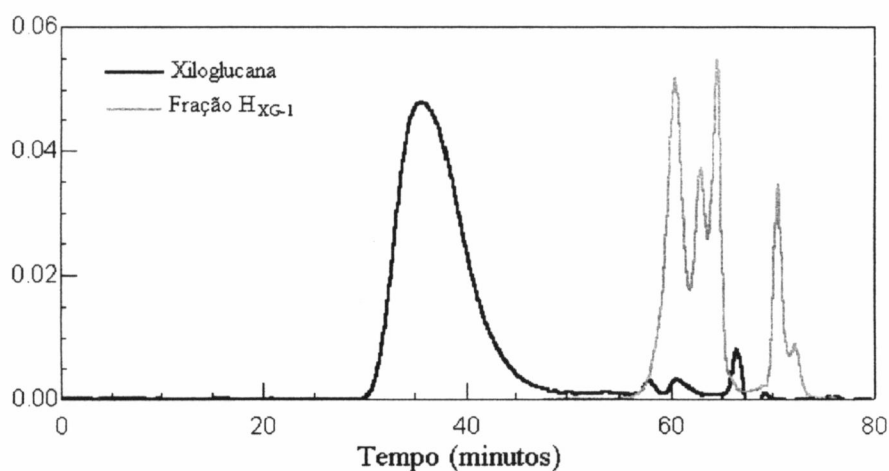


Figura 29. Perfil de eluição da xiloglucana e fração H_{XG-1} obtida das sementes de *Hymenaea courbaril*, através de HPSEC utilizando-se o detector de índice de refração.

O perfil de eluição obtido por HPSEC para as frações H_{XG-1} obtidas das folhas (Figura 28) e das sementes (Figura 29) de *Hymenaea courbaril*, mostra que estas frações são heterogêneas. No perfil de eluição da fração H_{XG-1} obtida da xiloglucana de folha, pode-se observar a presença de dois picos (I e II), que correspondem a hidrolisados de maior massa molecular, que não foram encontrados na fração H_{XG-1} obtida a partir do polissacarídeo das sementes. Estas frações de maior massa na xiloglucana estrutural sugerem que este polímero apresenta um maior impedimento estérico para a ação da enzima, apesar de sua massa molecular ser ~10 vezes menor do que a da xiloglucana de reserva. Uma possível justificativa para este resultado é a presença de fucose no polímero das folhas, que alteraria a conformação do polissacarídeo, dificultando a ação da enzima.

Por isso, a conformação dos polissacarídeos das sementes e das folhas foi determinada através de análise de HPSEC-MALLS. A habilidade das técnicas de “light scattering” na determinação de parâmetros relacionados a tamanho é de grande importância para a determinação da conformação. O raio de giro (R_G) é proporcional ao tamanho geométrico das moléculas, sendo que o raio de giro versus a massa molar (M_w) fornece informações sobre a conformação da molécula. Na Figura 30A e B são apresentados os gráficos de $R_G \times M_w$ para a xiloglucana de folhas e sementes de *Hymenaea courbaril*. Quando R_G varia muito em função de M_w , inclinação da reta ≈ 1 , próxima a 90° , tem-se uma molécula mais rígida, com conformação em bastão. Moléculas mais flexíveis apresentam inclinação da reta $\approx 0,5$, apresentando conformação emaranhado ao acaso. Para moléculas esféricas, o raio é proporcional a raiz cúbica da massa. Neste caso, R_G varia pouco em função de M_w e a inclinação da reta é de $\approx 0,33$ (WYATT, 1993).

Na Figura 30A pode-se observar uma grande variação (flutuação) nos valores do gráfico de raio de giro em função da massa molecular para a xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*. Moléculas menores (da ordem 10^4) apresentam esta variação de valores devido a limitações de resolução (WYATT, 1993). O $R_G \times M_w$ para a xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* forneceu inclinação da reta de 0,77, o que sugere uma conformação em bastão para a molécula, já a xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* o valor obtido foi de 0,44, o que indica conformação emaranhado ao acaso. A conformação em forma de bastão das xiloglucanas das folhas de *Hymenaea courbaril*, provavelmente é mais favorável à interação com as microfibrilas de celulose, o que é compatível com a função estrutural do polímero. Levy et al. (1991) através de modelagem molecular, concluíram que a conformação

especial das xiloglucanas fucosiladas é mais favorável à interação com a celulose do que a conformação adotada pelas xiloglucanas não fucosiladas.

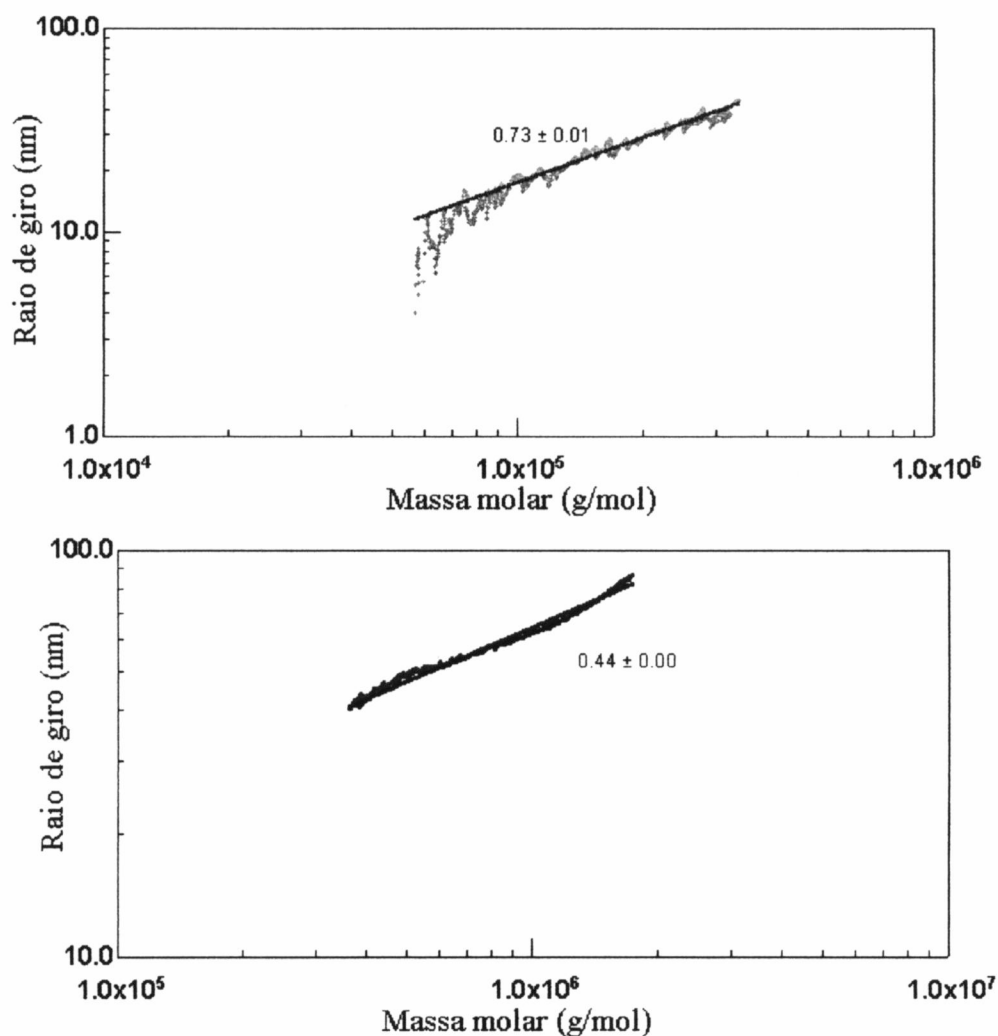


Figura 30. Raio de giro em função da massa molecular para a xiloglucana (A) de folhas e (B) de sementes de *Hymenaea courbaril*

A fração H_{XG-1} obtida das folhas de *Hymenaea courbaril*, que representa aproximadamente 1,5 % do polissacarídeo hidrolisado (H_{XG}), foi aplicada em coluna de Biogel P-60 e eluída com água. A partir de H_{XG-1} obteve-se o perfil apresentado na Figura 31, sendo que as amostras coletadas foram separadas em três frações, correspondentes aos tempos de retenção de 60-95 mL, 100-115 mL e 120-140 mL, denominadas **a**, **b** e **c**, respectivamente. Estas três frações foram analisadas por HPSEC-MALLS (Figura 32) e seus produtos de hidrólise analisados por GLC na forma de acetatos de alditóis, conforme apresentado na Tabela VIII.

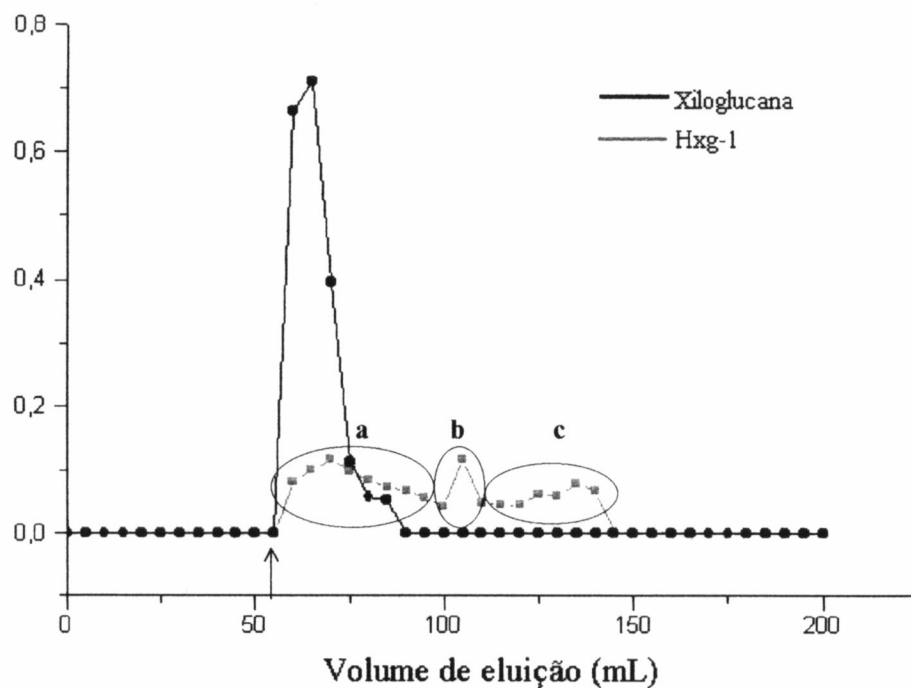


Figura 31. Perfil de eluição da xiloglucana e da fração H_{XG-1} das folhas de *Hymenaea courbaril*, em BioGel P-60. ↑, volume morto.

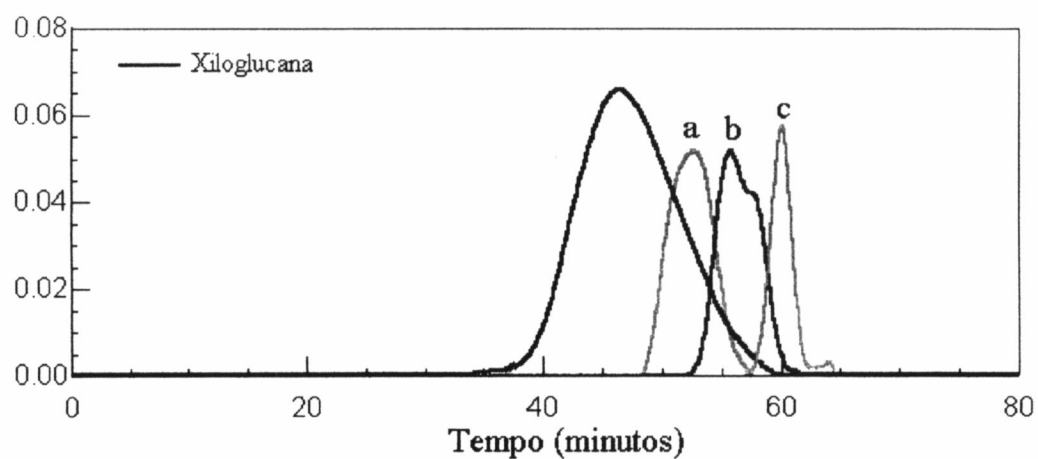


Figura 32. Perfil de eluição da xiloglucana e dos picos a,b,c da fração H_{XG-1} obtida das folhas de *Hymenaea courbaril*, através de HPSEC (detector IR).

TABELA VIII. Composição em açúcares neutros das frações **a**, **b** e **c** obtidas a partir da fração H_{XG-1} eluída no volume morto da coluna de Bio-Gel P-2, durante o fracionamento dos produtos de hidrólise enzimática da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*.

Fração	Mol% ^a						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
a	3,9	5,2	3,8	15,6	37,6	11,7	22,2
b	3,5	6,9	12,4	19,3	12,5	13,5	27,9
c	7,2	6,2	10,3	20,8	9,8	16,5	29,2

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

Os picos **I**, **II** e **III** (Figura 26) e **a**, **b** e **c** (Figura 31) da fração H_{XG-1} antes e após a cromatografia por gel-permeação respectivamente, devem corresponder às mesmas frações, apesar de não apresentarem exatamente o mesmo tempo de retenção na análise por HPSEC. Na Tabela VIII as proporções de glucose, xilose, galactose e fucose, indicam que nos três picos (**a**, **b** e **c**) obtidos a partir da fração H_{XG-1} estão presentes fragmentos da xiloglucana que foram parcialmente resistentes a ação da enzima. O maior tempo de retenção das frações **a**, **b** e **c**, em relação ao polissacarídeo (Figura 31) indica que o polímero foi hidrolisado em alguns pontos obtendo-se fragmentos de massa molecular (M_w) menor do que a do polissacarídeo (49.500), mas com M_w superior a 5.000, que corresponde ao limite de exclusão das colunas utilizadas na análise de HPSEC.

Vincken et al. (1996) hidrolisaram enzimaticamente a xiloglucana de maçã e obtiveram o XXXG, XLFG, XXFG e XLFG como os principais oligossacarídeos. Foi observado o acúmulo do fragmento XLFGXLFG e que a clivagem do fragmento XLFGXXXG foi facilitada após a remoção da fucose, o que sugere que as cadeias laterais fucosiladas dificultam a ação das endoglucanases. Resultados semelhantes foram obtidos por Hisamatsu et al. (1992) e York et al. (1995) após a hidrólise de *Acer pseudoplatanus* com uma mistura de endoglucanases. Este menor acesso enzimático provocado pelos oligossacarídeos fucosilados pode ser explicado pelos estudos da xiloglucana por modelagem molecular realizados por Levy et al. (1991). Em solução a xiloglucana adota uma conformação “twisted” e a cadeia lateral de trissacarídeo se aproxima do terminal redutor. Além disso, Vincken et al. (1996) observaram que a ligação dos oligossacarídeos no fragmento XLFGXLFG foi a menos

preferida para a ação da enzima, indicando que as unidades de galactose também poderiam estar dificultando o acesso da endoglucanase. Mais recentemente, Tiné, Lima e Buckeridge (2003) observaram que as unidades de galactose modulam a ação da celulase em xiloglucanas de reserva, sendo que porções menos ramificadas do polissacarídeo são preferenciais para o ataque da enzima.

Na xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* os oligossacarídeos XLFG e XXFG correspondem a 58 % do polissacarídeo o que poderia explicar a maior dificuldade do acesso enzimático ao polissacarídeo das folhas em relação ao das sementes. Além disso, as frações a, b e c (Tabela VIII), obtidas a partir de H_{XG-1}, apresentaram Glc: Xyl: Gal: Fuc nas proporções relativas de aproximadamente 4: 3: 2,3: 1 respectivamente, enquanto que para a xiloglucana intacta as proporções obtidas foram de 6: 4,5: 1,7: 1 (Tabela III, página 58). Estes resultados mostram que em H_{XG-1}, as proporções relativas de glucose e xilose são menores do que no polissacarídeo, e conseqüentemente galactose e fucose são maiores, indicando que nos fragmentos de xiloglucana que não sofreram ação da celulase, predominam cadeias laterais galactosiladas e fucosiladas, o que confirma a hipótese de que estas cadeias laterais dificultariam o acesso enzimático ao polissacarídeo.

Analisando-se ainda a Tabela VIII pode-se observar que a fração H_{XG-1} apresentou aumento nas proporções de ramnose, arabinose e manose, em relação ao polissacarídeo original (fração XG-IHB, Tabela III, página 58), indicando contaminantes na fração XG-IHB, os quais após a hidrólise da xiloglucana, foram eluídos no volume morto da coluna de BioGel P-2. A fração a apresentou alta proporção relativa de manose, também observada em pequena proporção na análise de metilação do polissacarídeo (Tabela IV, página 61). Conforme já relatado, a presença deste monossacarídeo após a purificação de xiloglucanas já foi descrita anteriormente (O'NEILL e SELVENDRAN, 1983; REDGWELL e SELVENDRAN., 1986; VINCKEN et al., 1994; VINCKEN et al., 1996; SOUZA-LIMA, 1997; CUTILLAS-ITURRALDE et al., 1998). Já nas frações b e c, além do aumento da manose, pode ser observado maiores proporções de ramnose e arabinose, que indicam a presença de pectinas. É importante lembrar que H_{XG-1} corresponde a uma fração muito pequena (~ 1,5%) do material hidrolisado, portanto a concentração destes contaminantes na fração XG-IHB é proporcionalmente muito menor do que a da xiloglucana. Isto pode ser verificado também através da análise de HPSEC-MALLS (Figura 8, página 58). Estes contaminantes não provocaram distorções no perfil de eluição do polissacarídeo principal, que foi considerado homogêneo.

5.3.3.2. Fração oligossacarídica H_{XG-2}

No espectro de ESI-MS da fração oligossacarídica H_{XG-2} (Figura 33) foram identificados os íons moleculares m/z 1246 ($M+Na$)⁺, 1393($M+Na$)⁺ e 1555 ($M+Na$)⁺, correspondentes ao octassacarídeo XXLG, nonassacarídeo XXFG e ao decassacarídeo XLFG, respectivamente.

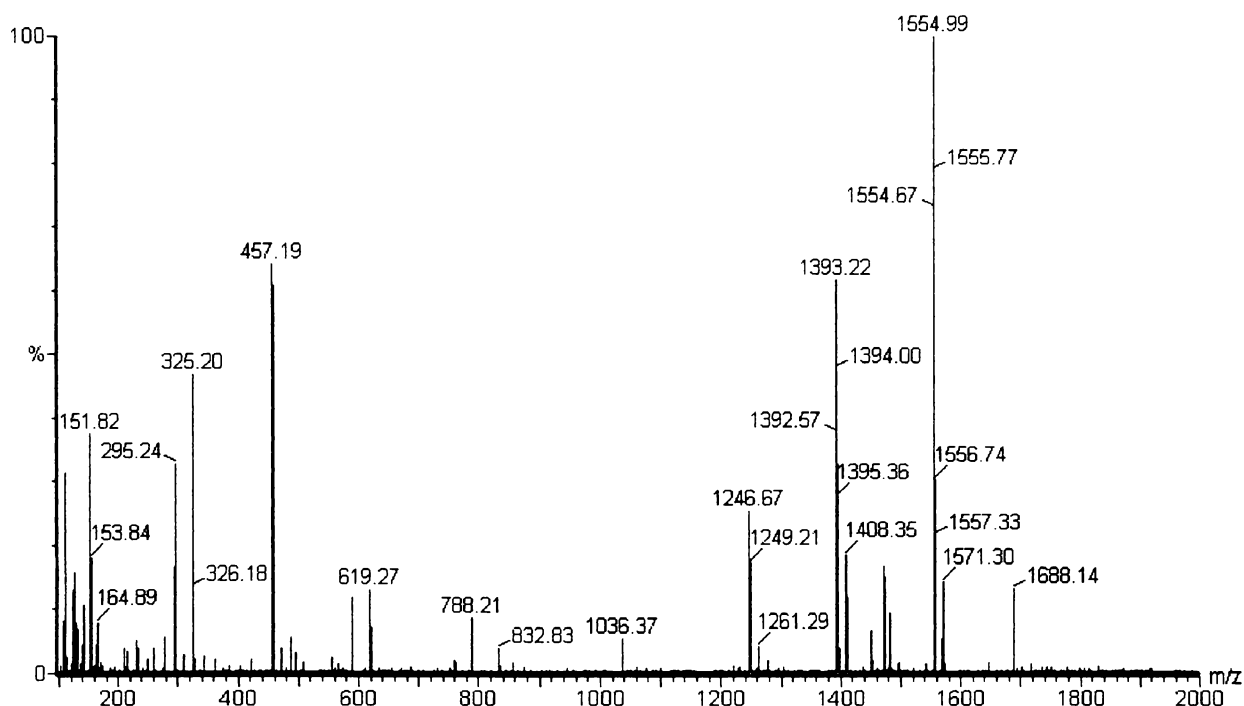


Figura 33. Espectro de ESI-MS da fração oligossacarídica H_{XG-2} (modo positivo).

Estes oligossacarídeos foram separados por HPLC, utilizando-se coluna semi-semi-preparativa C-18, SHIM-PACK PREP-ODS PN, sendo inicialmente utilizado como eluente metanol 7%. O perfil de eluição obtido está apresentado na Figura 34A, onde pode-se observar a presença de um pico homogêneo com tempo de retenção de 41 minutos e um pico heterogêneo em torno de 33 minutos. O pico com tempo de retenção de 41 minutos foi analisado por ESI-MS (Figura 36). O pico com tempo de retenção de 33 minutos foi recromatografado utilizando-se metanol 5% como eluente (Figura 34B), sendo que ocorreu um ligeiro afastamento das duas frações presentes no pico 33, por isso a concentração de metanol do eluente foi diminuída para 3%, sendo o perfil de eluição mostrado na Figura 33C. Com metanol 3% também não houve separação total dos dois picos. Foram coletadas amostras do final do pico 35, que foram analisadas por ESI-MS (Figura 35).

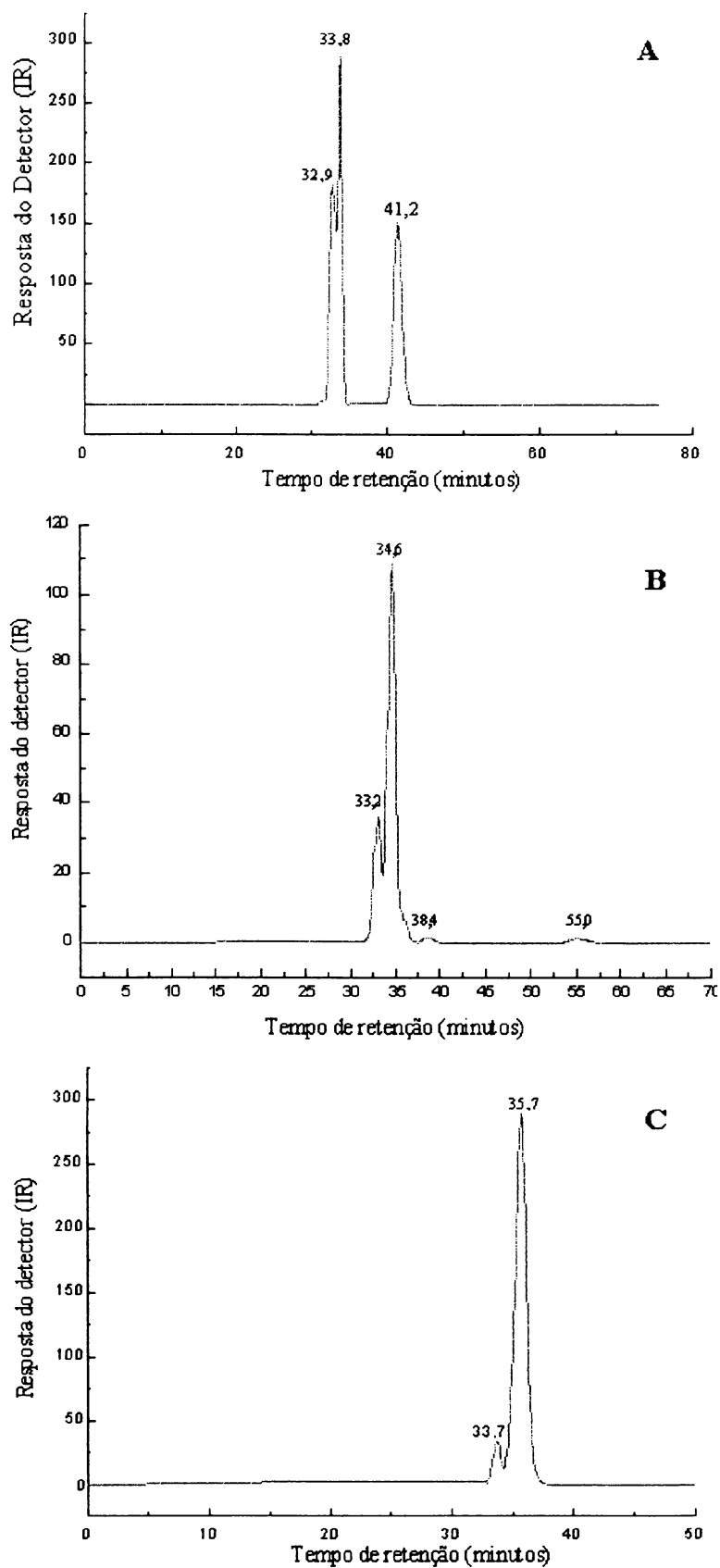


Figura 34. Perfil de eluição da fração oligossacarídica H_{XG-2} em HPLC, coluna semi-preparativa C-18, SHIM-PACK PREP-ODS PN, eluída com (A) 7%, (B) 5% e (C) 3% de metanol em água.

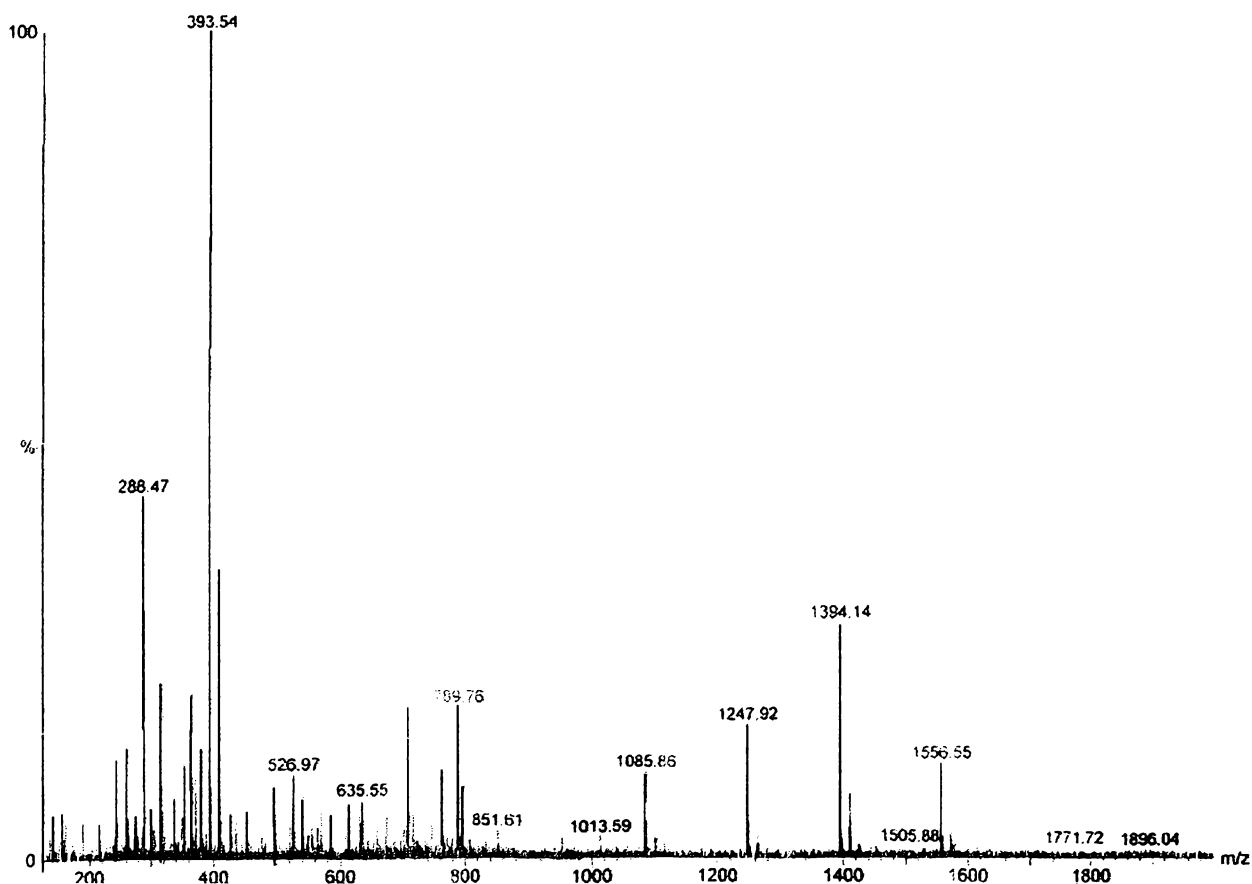


Figura 35. Espectro de ESI-MS do pico 35 da fração oligossacarídica H_{XG-2} (modo positivo).

Na Figura 35 pode-se observar a presença do íon molecular m/z 1394 ($M+Na^+$), que corresponde ao nonassacarídeo XXFG. A presença dos íons moleculares m/z 1247 ($M+Na^+$) e 1085 ($M+Na^+$) pode indicar que ocorreu a fragmentação do nonassacarídeo ou que nesta fração também estão presentes os oligossacarídeos XXLG e XXXG. No entanto, o íon molecular m/z 1556 ($M+Na^+$), indica que nesta fração tem-se uma mistura de pelo menos dois oligossacarídeos: XLFG e XXFG.

O pico 41 da fração oligossacarídica H_{XG-2} corresponde ao decassacarídeo XLFG identificado por ESI-MS (Figura 36) e por RMN bidimensional HMQC (Figuras 37 e 38) e TOCSY (Figura 39), respectivamente; Tabela IX. A estrutura proposta para este oligossacarídeo está apresentada na Figura 40.

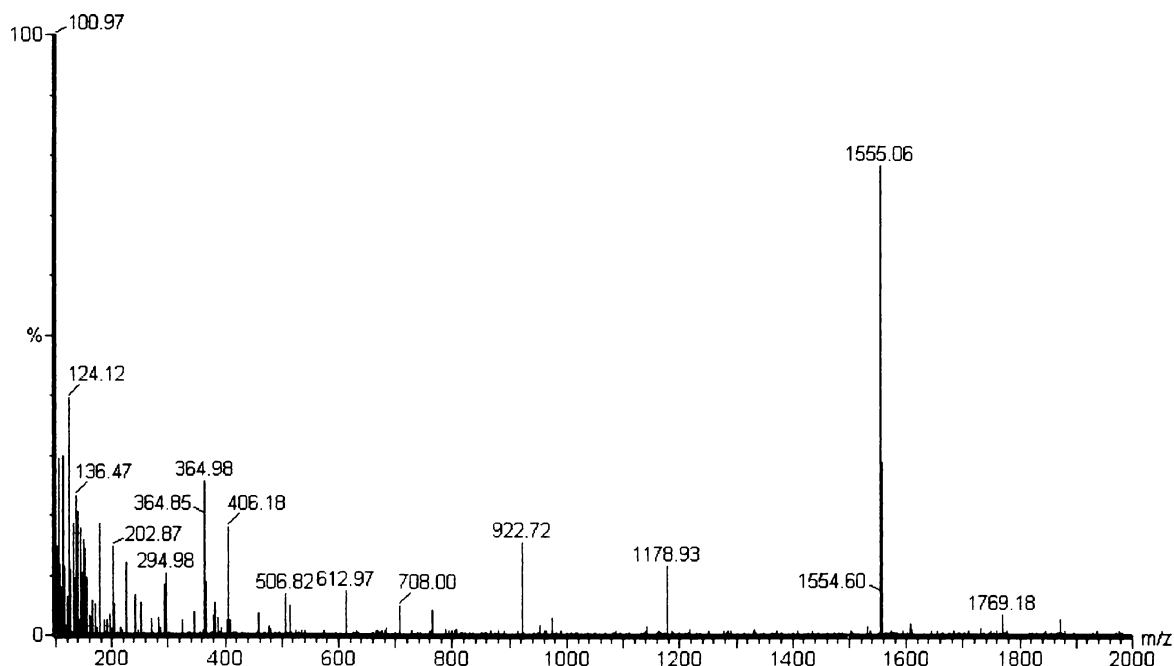


Figura 36. Espectro de ESI-MS do oligossacarídeo XLFG (modo positivo).

No espectro de HMQC (Figuras 37 e 38) do oligossacarídeo XLFG dois sinais de C-6 de fucose (δ 15,60 e 16,2) são observados. Dois sinais na região de C-6 da fucose também foram encontrados por Watt et al. (1999), analisando os oligossacarídeos XXFG e XLFG da xiloglucana de maçã. Estes sinais foram atribuídos ao efeito dos anômeros α - e β - das unidades de glucose redutora do oligossacarídeo sobre as unidades de fucose. Levy et al. (1991), através de modelagem molecular, observaram a proximidade da fucose à cadeia principal de glucose, o que levaria o polissacarídeo a adotar uma conformação que facilitaria a interação com a celulose. Moléculas de xiloglucana que contém repetições da cadeia lateral trissacarídica apresentam maior capacidade de interagir com as microfibrilas de celulose do que as xiloglucanas não fucosiladas, o que explicaria a presença das unidades de fucose nas xiloglucanas estruturais.

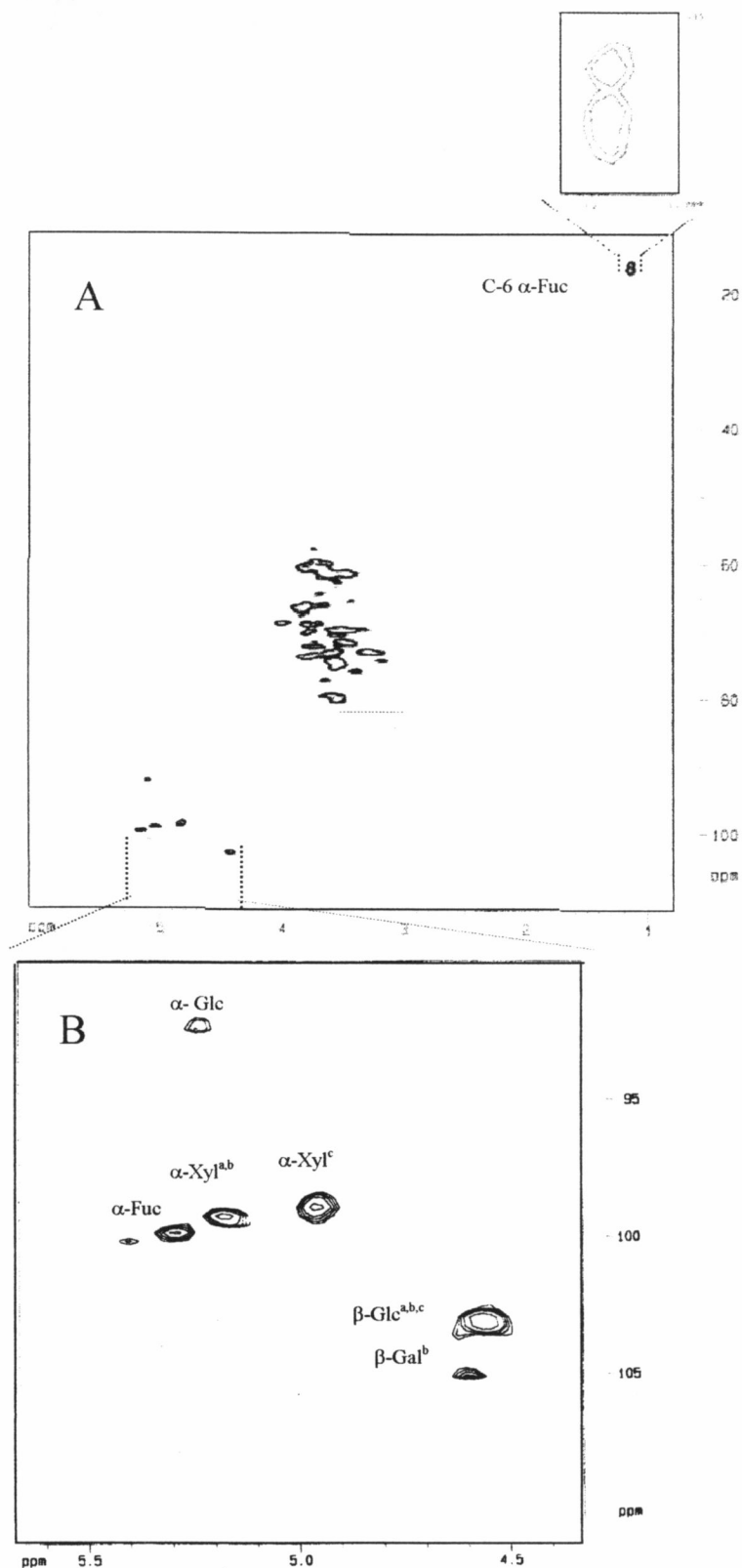


Figura 37. Espectro de HMQC (A) do oligossacarídeo XLFG e (B) da região anomérica (D₂O, 30 °C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

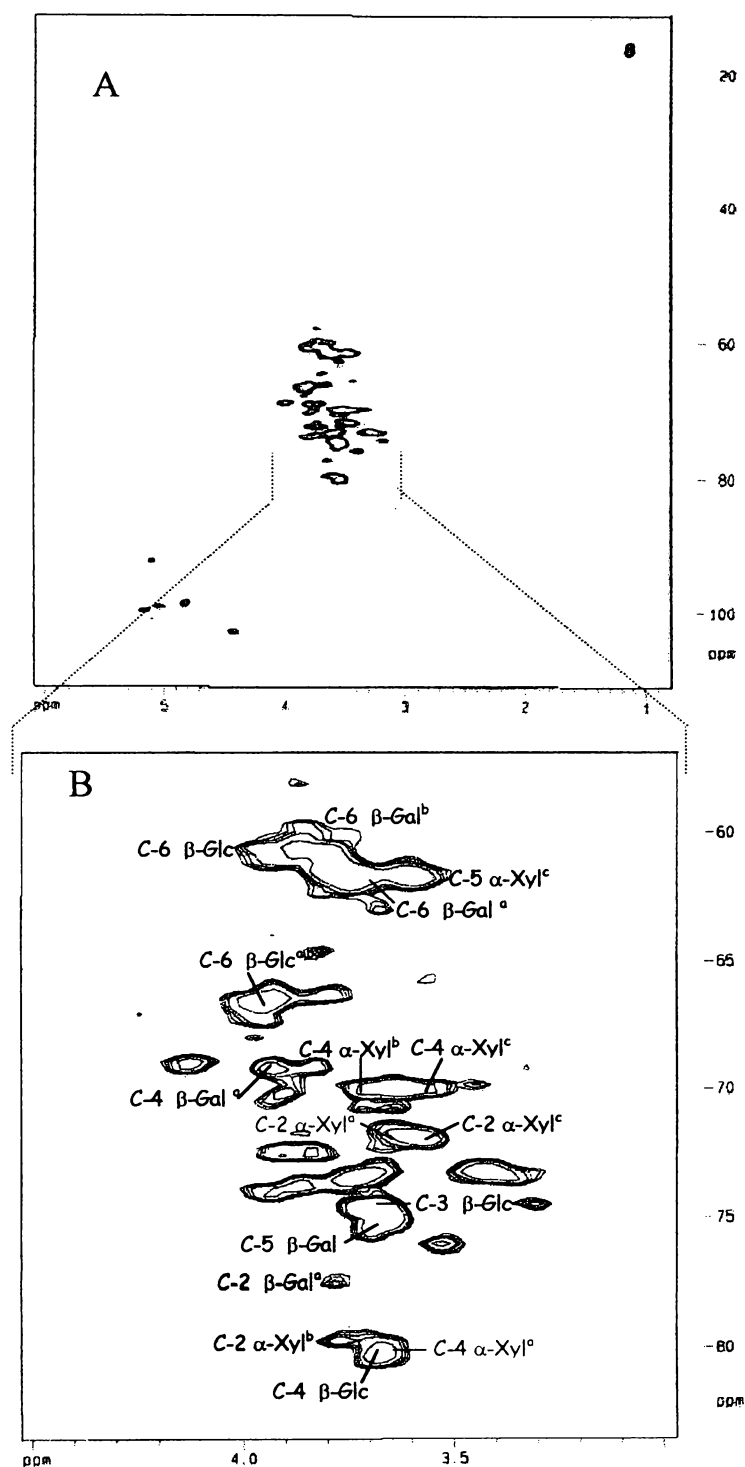


Figura 38. Espectro de HMQC (A) do oligossacarídeo XLFG e (B) região de 55 a 85 ppm (D_2O , 30 °C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

Conforme relatado anteriormente, alguns autores atribuíram todos os sinais de ^1H -RMN para os oligossacarídeos fucosilados (YORK et al. 1990; SPRONK et al., 1998). Entretanto, poucos sinais de ^{13}C -RMN já foram atribuídos para estes oligossacarídeos (BUCHALA et al. 1993; WATT et al., 1999). Com relação às unidades monossacarídicas que aparecem somente nos oligossacarídeos fucosilados, nossos experimentos (Tabela IX) permitiram atribuir os deslocamentos químicos de praticamente todos os prótons de Gal^a (unidade de galactose substituída por fucose). Entretanto no espectro de HMQC (Figura 38) foi possível identificar somente C-2 e C-6 (δ 77,8 e 60,39 respectivamente) para estas unidades. Quanto às unidades de fucose, foram assinalados quase todos os sinais de ^1H e ^{13}C -RMN, sendo exceções os sinais de C-5 e H-5. No espectro de HMQC foram identificados: C-1 (δ 99,7), C-2 (δ 69,13), C-3 (δ 70,15), C-4 (δ 72,3) e C-6 (δ 15,39 e 16,2 ppm) para estas unidades, sendo que os sinais de C-2, C-3 e C-5 não foram atribuídos anteriormente, tanto para XLFG quanto para o XXFG provenientes de xiloglucanas de outras fontes. Assim como para o polissacarídeo, os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H -RMN atribuídos para as unidades de xilose terminal e substituídas em O-2 por galactose apresentam uma boa correlação com aqueles atribuídos para os oligossacarídeos da xiloglucana de sementes de tamarindo, da casca da semente de colza (YORK et al., 1990; YORK et al., 1993) e com os oligossacarídeos da xiloglucana de maçã (WATT et al., 1999). No espectro de TOCSY (Figura 39), as correlações permitiram identificar os deslocamentos químicos de H-1 (δ 5,14), H-2 (δ 3,786), H-3 (δ 3,807), H-4 (δ 3,661) e H-3 (δ 4,115) das unidades de xilose substituídas pelo dissacarídeo fucosil galactose. Quanto aos sinais de ^{13}C -RMN, foram atribuídos C-1 (δ 99,12), H-2 (δ 3,620) e C-4 (δ 80,18). Estes assinalamentos indicam que no decassacarídeo XLFG, as unidades de Xyl^a apresentam substituição em O-4, o que confirma os resultados obtidos para a xiloglucana intacta.

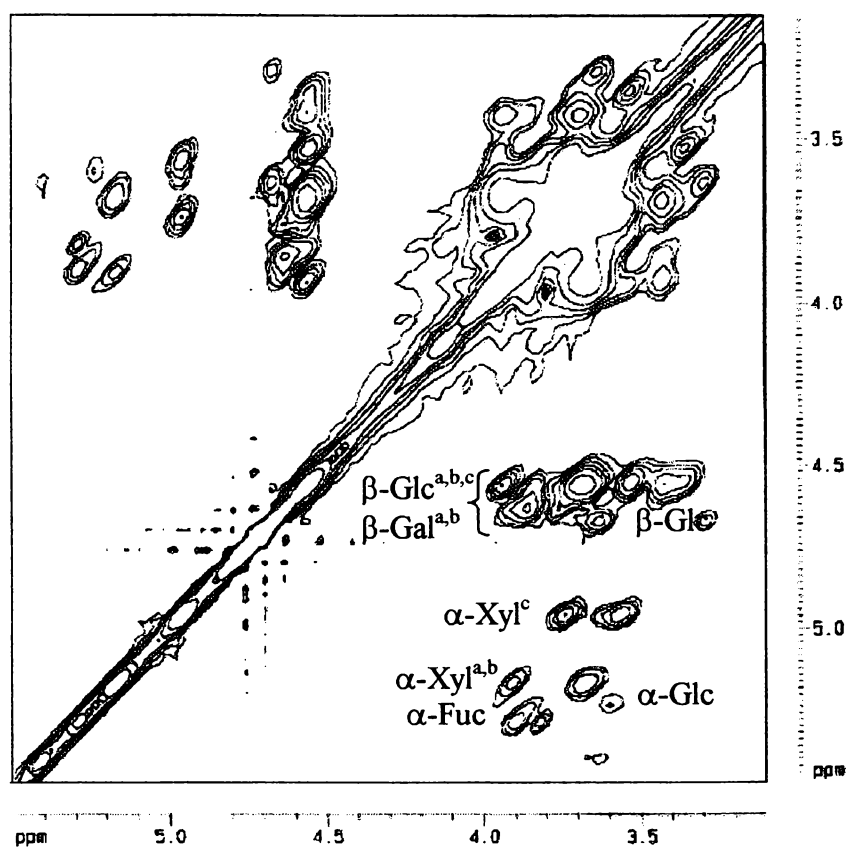


Figura 39. Espectro de TOCSY do oligossacarídeo XLFG (D₂O, 30 °C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

Tabela IX. Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H -NMR do oligossacarídeo XLFG da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*.

Unidade	C-1 (H-1)	C-2 (H-2)	C-3 (H-3)	C-4 (H-4)	C-5 (H-5)	C-6 (H-6)
α -Glc	92,00 (5,227)	n.d. (3,567)	n.d. (3,805)	n.d. n.d.	n.d. n.d.	60,49 (3,870)
β -Glc	n.d. (4,630)	n.d. (3,286)	n.d. (3,641)	n.d. (3,682)	n.d. n.d.	60,49 (3,870)
β -Glc ^{a,b,c}	103,05 (4,547)	73,23 (3,418)	75,22 (3,665)	80,26 (3,669)	73,74 (3,825)	66,98 (3,969)
α -Xyl ^c	98,79 (4,950)	71,90 (3,560)	73,73 (3,865)	70,62 (3,707)	61,52 (3,747)	- -
α -Xyl ^b	99,12 (5,171)	79,73 (3,768)	72,46 (3,838)	70,65 (3,631)	61,52 (3,590)	- -
α -Xyl ^a	99,12 (5,144)	71,70 (3,620)	n.d. (3,820)	80,18 (3,661)	n.d. (4,115)	- -
β -Gal ^b	105,4 (4,581)	71,9 (3,560)	73,44 (3,613)	n.d. (n.d.)	74,16 (3,681)	60,689 (3,786)
β -Gal ^a	n.d. (4,647)	77,47 (3,716)	n.d. (3,828)	n.d. (3,905)	n.d. n.d.	60,39 (3,859)
α -Fuc	99,70 (5,284)	69,13 (3,794)	70,15 (3,901)	72,3 (3,838)	n.d. n.d.	15,6/ 16,2 (1,144/ 1,143)

n.d.: não determinado.

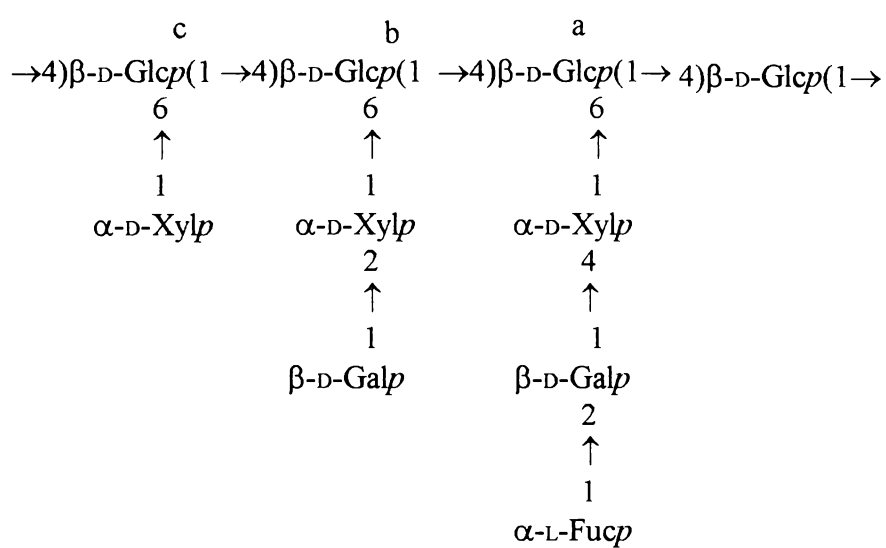


Figura 40. Estrutura do oligossacarídeo XLFG obtido da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*.

5.3.3.3. Fração oligossacarídica H_{XG-3}

Na fração oligossacarídica H_{XG-3} analisada por ESI-MS (Figura 41), o heptassacarídeo XXXG foi identificado como o principal oligossacarídeo. No entanto, os íons moleculares m/z 1247, 1393 e 1555 indicam a presença dos oligossacarídeos com maior D.P. Por isso, a fração H_{XG-3} foi purificada por HPLC utilizando-se coluna semi-preparativa C-18, SUPELCOSIL PLC-18 (Figura 42), obtendo-se um pico principal com tempo de retenção de 25 minutos. Este pico foi analisado por ESI-MS (Figura 43), correspondendo ao heptassacarídeo XXXG, íon molecular m/z 1085 ($M+Na$)⁺.

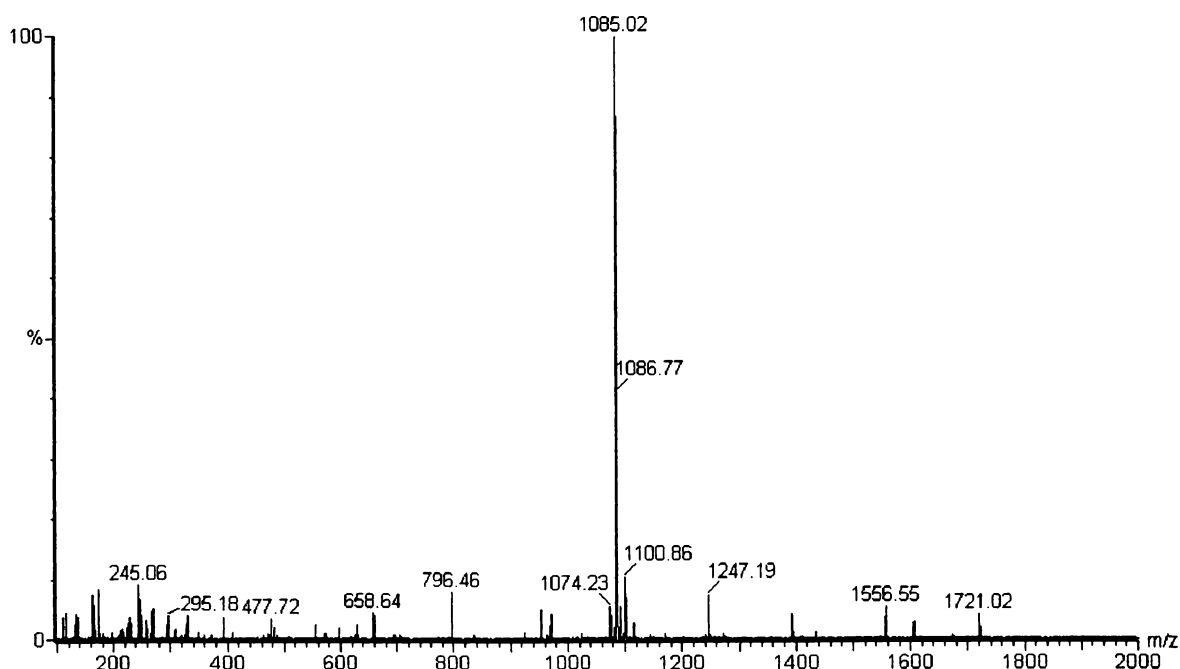


Figura 41. Espectro de ESI-MS da fração oligossacarídica H_{XG-3} (modo positivo).

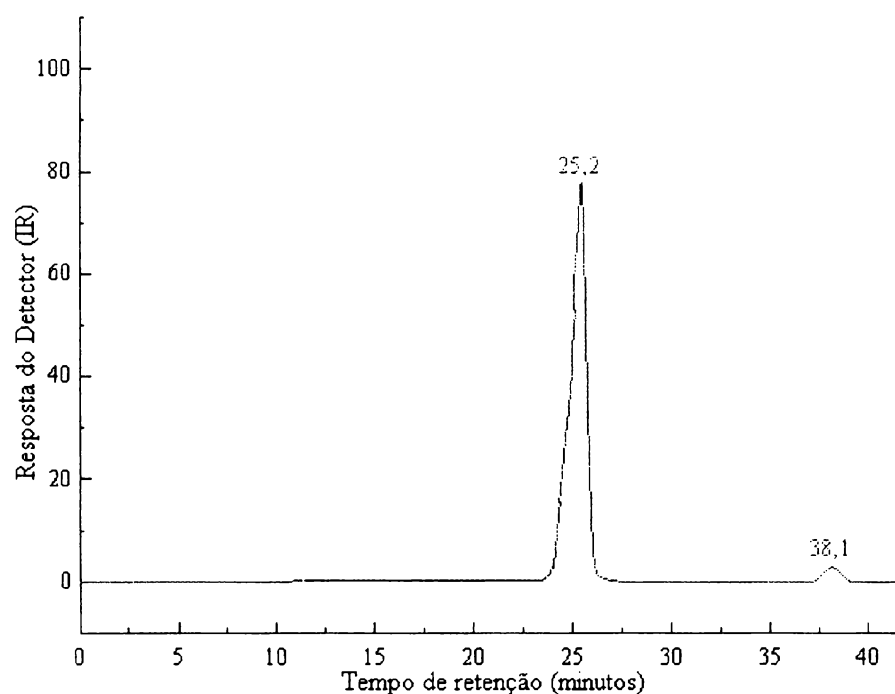


Figura 42. Perfil de eluição da fração oligossacarídica H_{XG-3} em HPLC, coluna semi-preparativa C-18, SUPELCOSIL PLC-18, eluída com 3% de metanol em água.

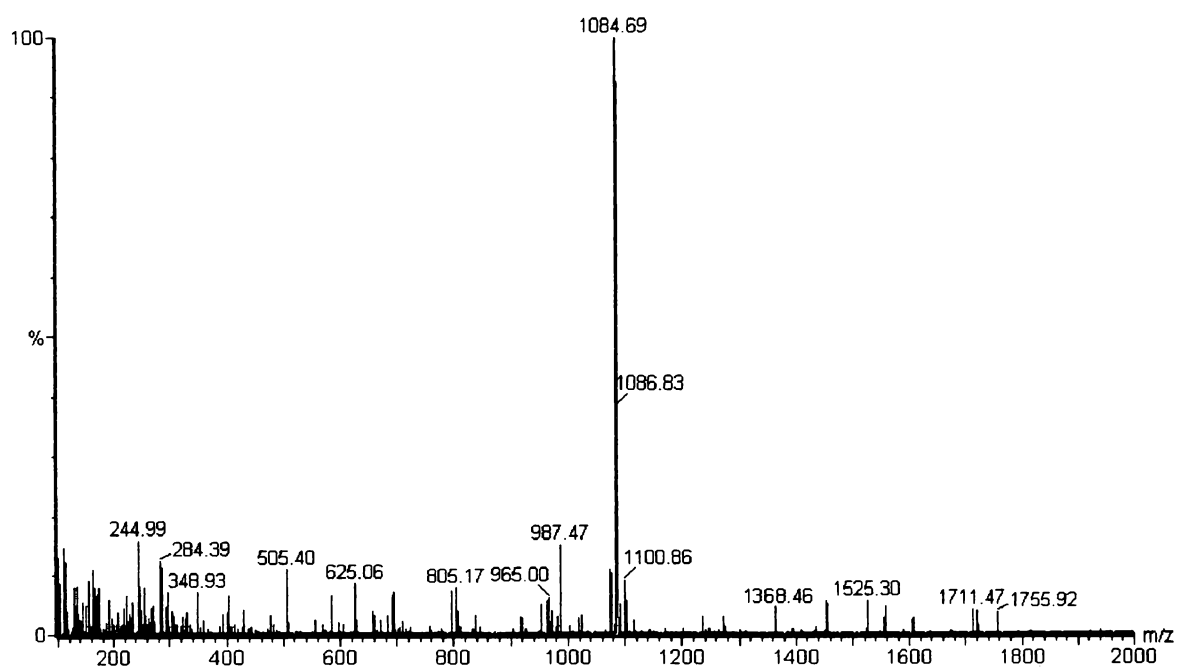


Figura 43. Espectro de ESI-MS do oligossacarídeo XXXG (modo positivo).

O heptassacarídeo XXXG foi examinado por espectroscopia de RMN em aparelho BRUKER DRX-400, com ressonância de ^1H de 400 MHz. As proporções relativas das unidades de xilose e glucose foram determinadas através da integração dos sinais da região anomérica do espectro de ^1H -RMN (Figura 44).

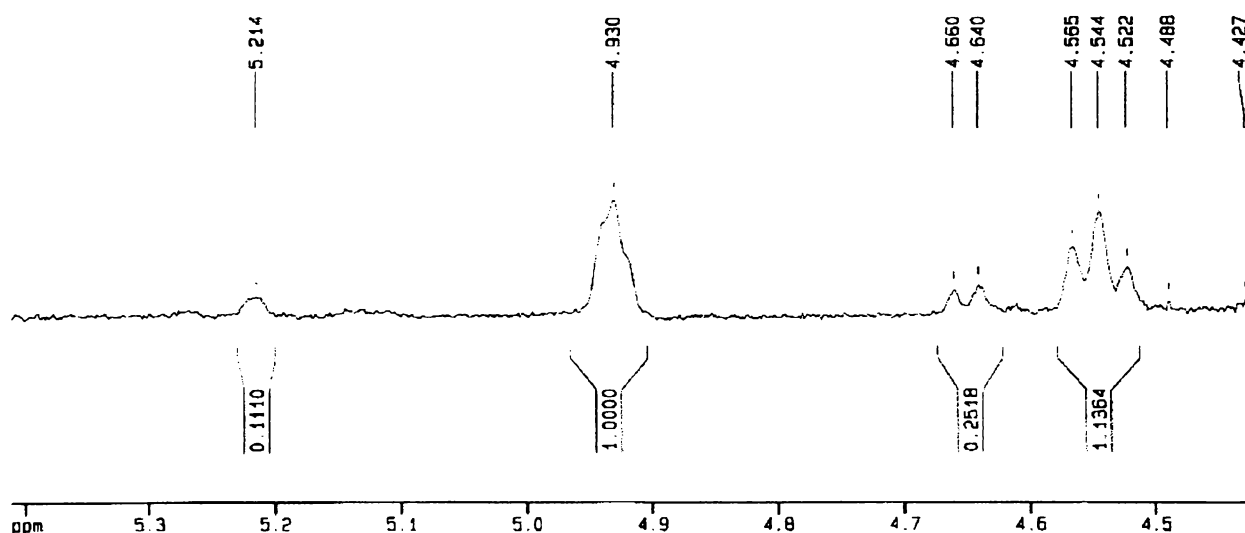


Figura 44. Integração da região anomérica do espectro de ^1H -RMN do oligossacarídeo XXXG (em D_2O), aparelho BRUKER DRX-400, a 30°C .

No oligossacarídeo XXXFG, os sinais dos prótons anoméricos (Figura 44) das unidades redutoras α e β (em proporção de 1:2), os quais estão ausentes no polissacarídeo nativo, foram detectados a 5,182 e 4,606 ppm, respectivamente. Os sinais para as unidades de glucose nas posições **a**, **b** e **c** estão a 4,565 ($J_{\text{H-1,H-2}}$ 8,0 Hz), 4,544 ($J_{\text{H-1,H-2}}$ 8,4 Hz) e 4,522 ppm ($J_{\text{H-1,H-2}}$ 8,8 Hz), respectivamente. O sinal das unidades de xilose (4,93 ppm) e os sinais para as unidades de glucose nas posições **a**, **b** e **c**, estão em proporção de aproximadamente 1:1.

O oligossacarídeo XXXG foi analisado por HMQC (Figuras 45 e 46) e TOCSY (Figura 47), sendo os sinais de ^{13}C - e ^1H -RMN atribuídos mostrados na Tabela X.

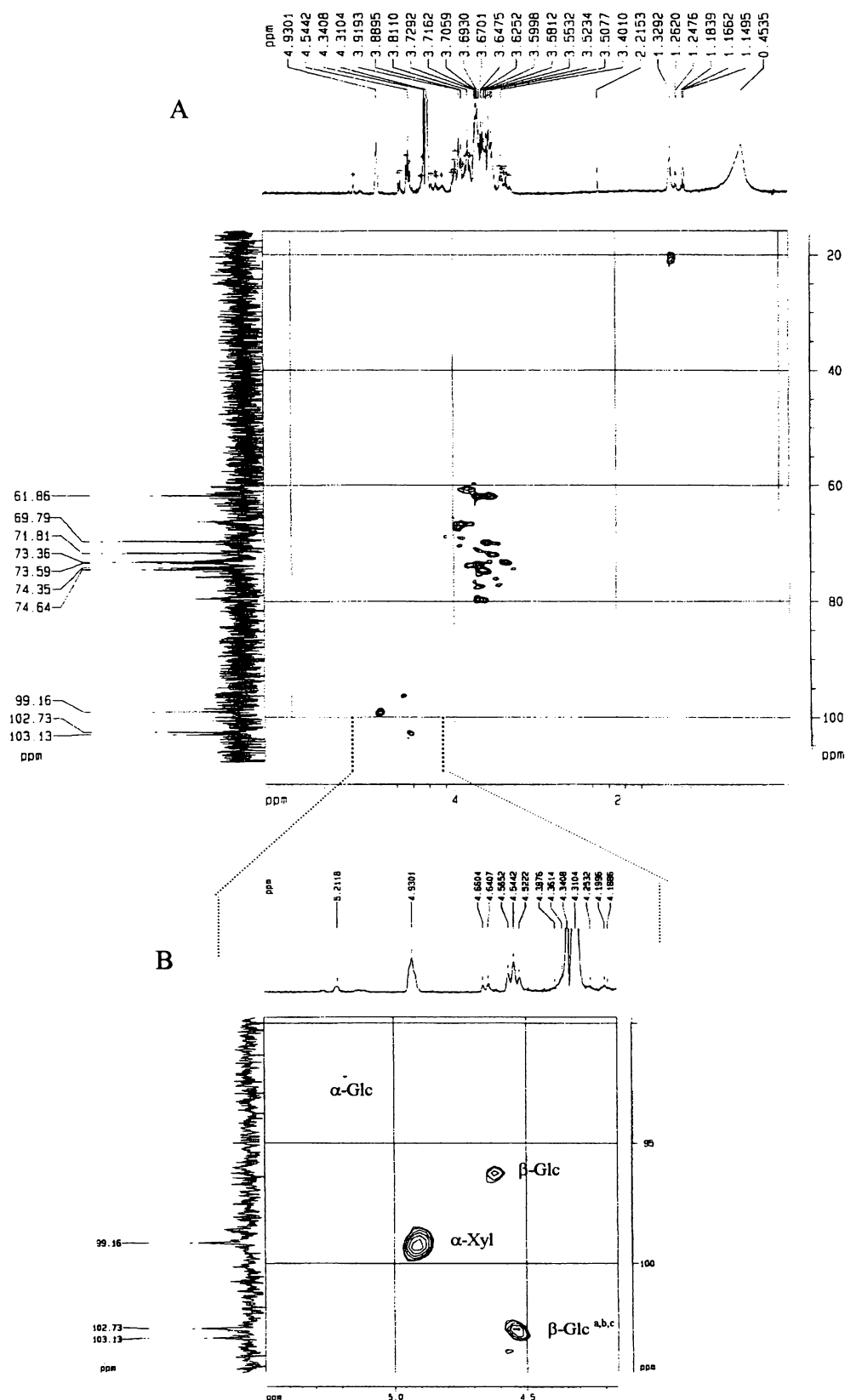


Figura 45. Espectro de HMQC (A) do oligossacarídeo XXXG e (B) ampliação da região anomérica, a 10 mg/mL (D_2O , 50 °C), em aparelho BRUKER DRX-400. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.

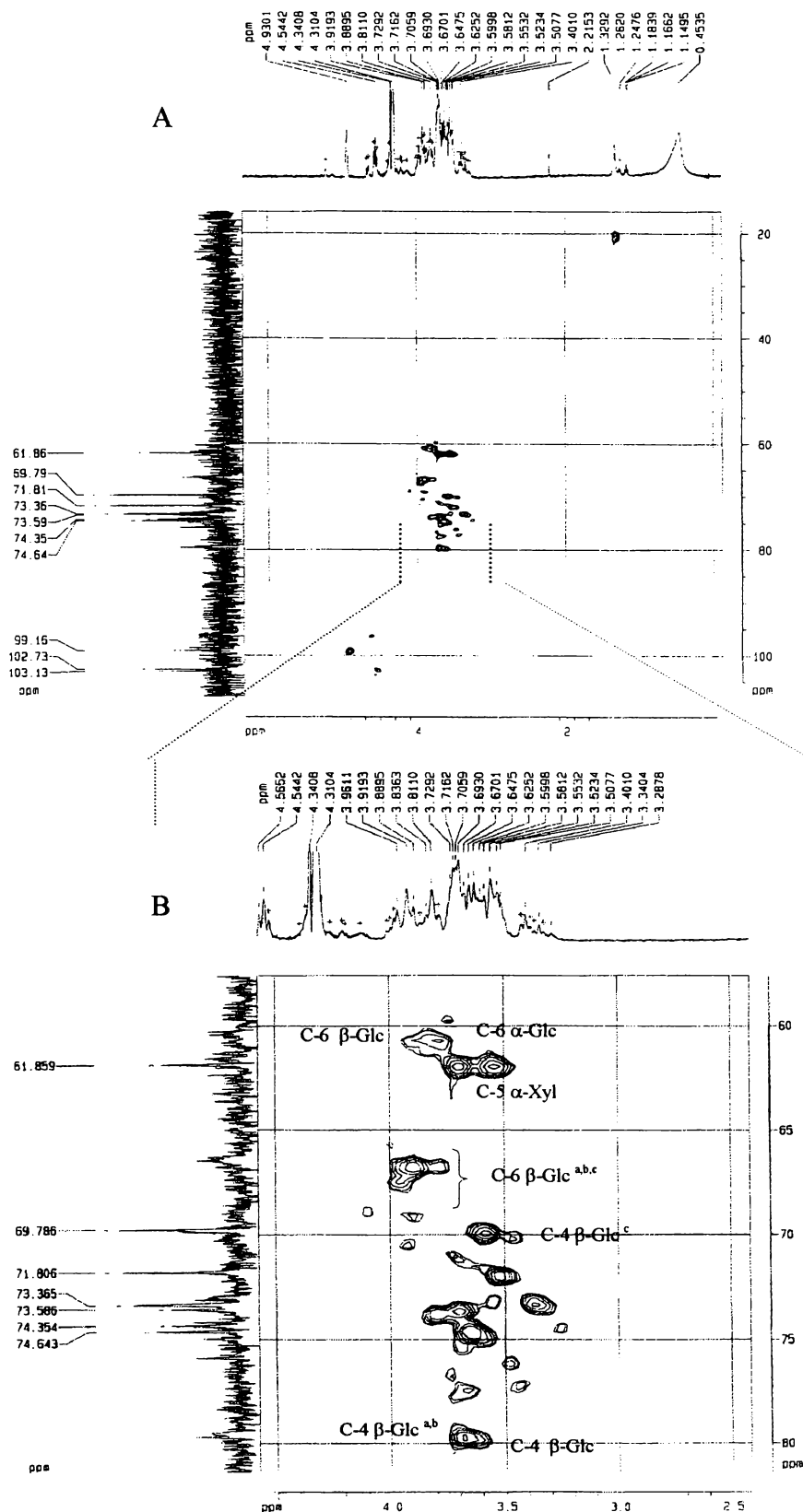


Figura 46. Espectro de HMQC (A) do oligossacarídeo XXXG, (B) ampliação da região de 55 a 80 ppm, a 10 mg/mL (D_2O , 50 $^\circ\text{C}$), em aparelho BRUKER DRX-400. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.

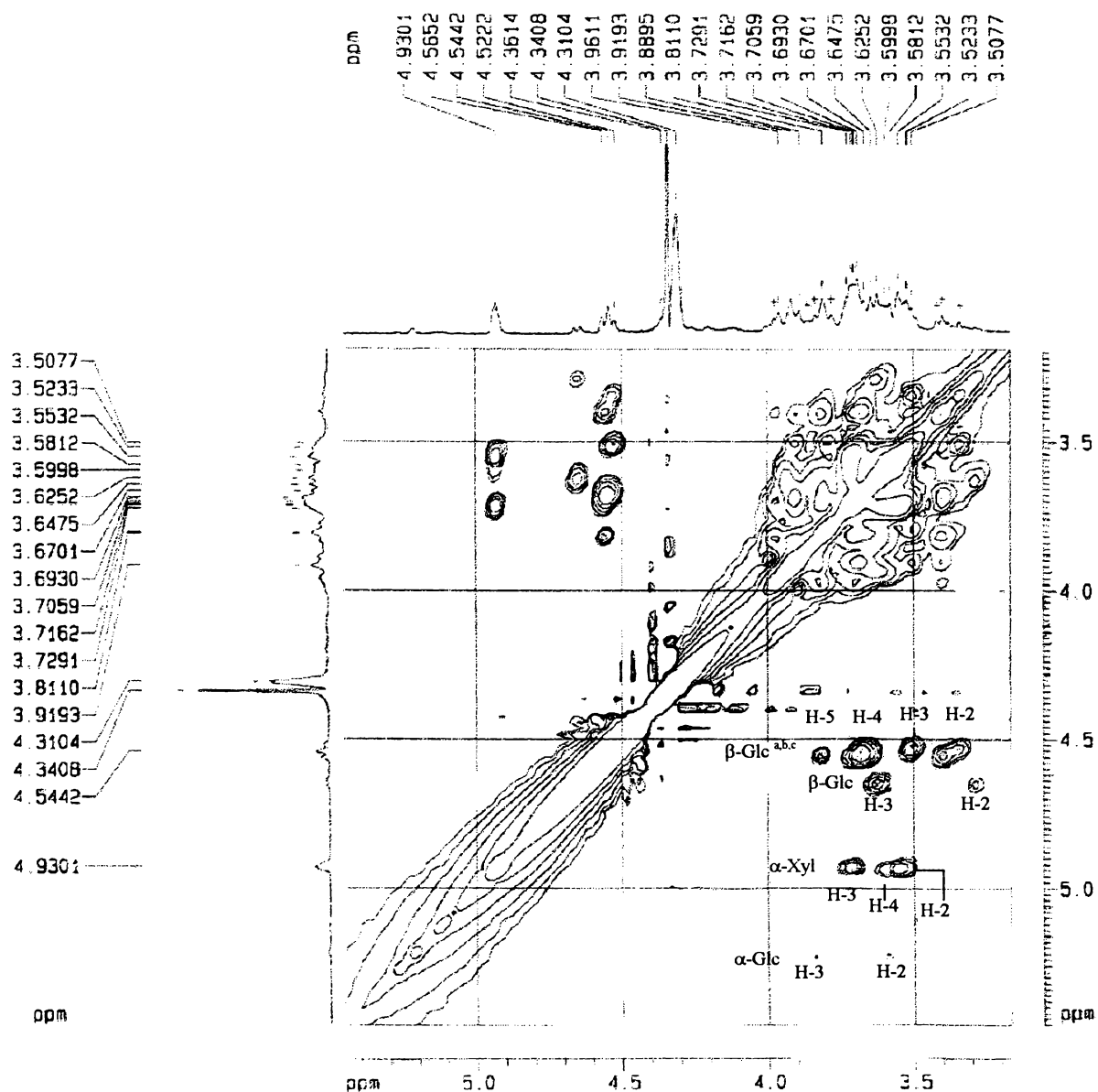
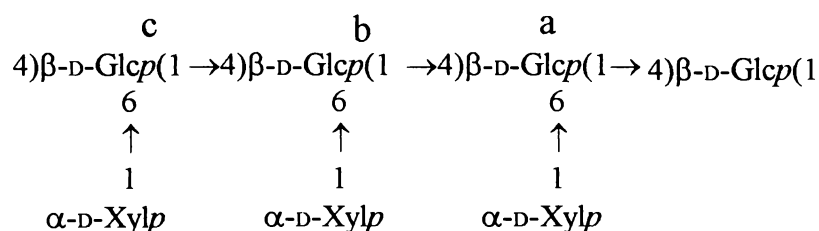


Figura 47. Espectro de TOCSY do oligossacarídeo XXXG, a 10 mg/mL (D_2O , 30 °C), em aparelho BRUKER DRX-400. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.

Tabela X. Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H -RMN do oligossacarídeo XXXG.

Unidade	C-1 (H-1)	C-2 (H-2)	C-3 (H-3)	C-4 (H-4)	C-5 (H-5)	C-6 (H-6)
α -Glc	92,00 (5,182)	n.d. (3,545)	n.d. (3,793)	78,70 (3,752)	n.d. n.d.	59,35 (3,737)
β -Glc	96,00 (4,660)	n.d. (3,241)	n.d. (3,764)	81,00 (3,590)	n.d. n.d.	60,49 (3,779)
β -Glc ^a	102,98 (4,565)	73,21 (3,363)	73,12 (3,545)	79,7 (3,734)	73,57 (3,697)	66,6 (3,782)
β -Glc ^b	102,98 (4,544)	73,21 (3,363)	73,12 (3,640)	79,9 (3,545)	73,76 (3,794)	67,28 (3,948)
β -Glc ^c	102,98 (4,522)	73,21 (3,363)	n.d. n.d.	69,81 (3,577)	74,62 (3,645)	66,60 (3,899)
α -Xyl ³	99,16 (4,939)	71,89 (3,508)	75,26 (3,688)	70,40 (3,750)	61,71 (3,688)	- -
α -Xyl ²	99,16 (4,939)	71,89 (3,508)	76,60 (3,731)	70,85 (3,717)	61,71 (3,688)	- -
α -Xyl ¹	99,16 (4,903)	71,89 (3,508)	n.d. n.d.	71,07 (3,702)	61,71 (3,688)	- -

n.d.: não determinado

Figura 48. Estrutura do oligossacarídeo XXXG obtido da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*.

Na região anomérica do espectro de HMQC do heptassacarídeo XXXG (Figura 44) pode-se observar os sinais de C-1 e H-1 das unidades de β -D-Glcp e α -D-Glcp redutora a 96,00 (4,606) ppm e 92,0 (5,182) ppm, respectivamente. Os sinais a 4,522, 4,544 e 4,522 ppm, provavelmente, referem-se as unidades de glucose na posição **a**, **b** ou **c** (Figura 48). Os sinais de C-1 e H-1 das unidades de α -D-Xylp aparecem em 99,16 (4,939) ppm. O sinal de C-6 das unidades de β -D-Glcp e α -D-Glcp redutora (Figura 46) estão a 59,35 e 60,49 ppm, respectivamente. O sinal de C-4 das unidades de β -D-Glcp substituídas em C-4 está a 79,70 ppm e das unidades de β -D-Glcp na posição **c** (não substituídas em C-4) a 69,81 ppm. Estas atribuições foram realizadas com base nos resultados obtidos por York et al. (1993) e Braccini et al. (1995).

Através do espectro de TOCSY (Figura 47) foi possível identificar os sinais a 3,545 e 3,793 ppm correspondentes a H₂ e H₃ das unidades de α -D-Glcp. O sinal a 3,241 ppm refere-se a H-2 das unidades de β -D-Glcp e o sinal a 3,363 ppm corresponde a H-2 das unidades de β -D-Glcp nas posições **a**, **b** e **c**.

5.3.3.4. Fração oligossacarídica H_{XG-4}

Na Figura 49 está apresentado o espectro de ESI-MS da última fração oligossacarídica coletada por cromatografia semi-preparativa de gel permeação (fração H_{XG-4}). No espectro de ESI-MS da fração oligossacarídica H_{XG-4} (Figura 49) foi identificado o íon molecular m/z 791 ($M+Na$)⁺, que corresponde ao pentassacarídeo XXG, contaminado pelos oligossacarídeos: XXXG (m/z 1085), XXFG (m/z 1393), XLFG (m/z 1555). Esta fração não foi purificada, devido ao seu baixo rendimento.

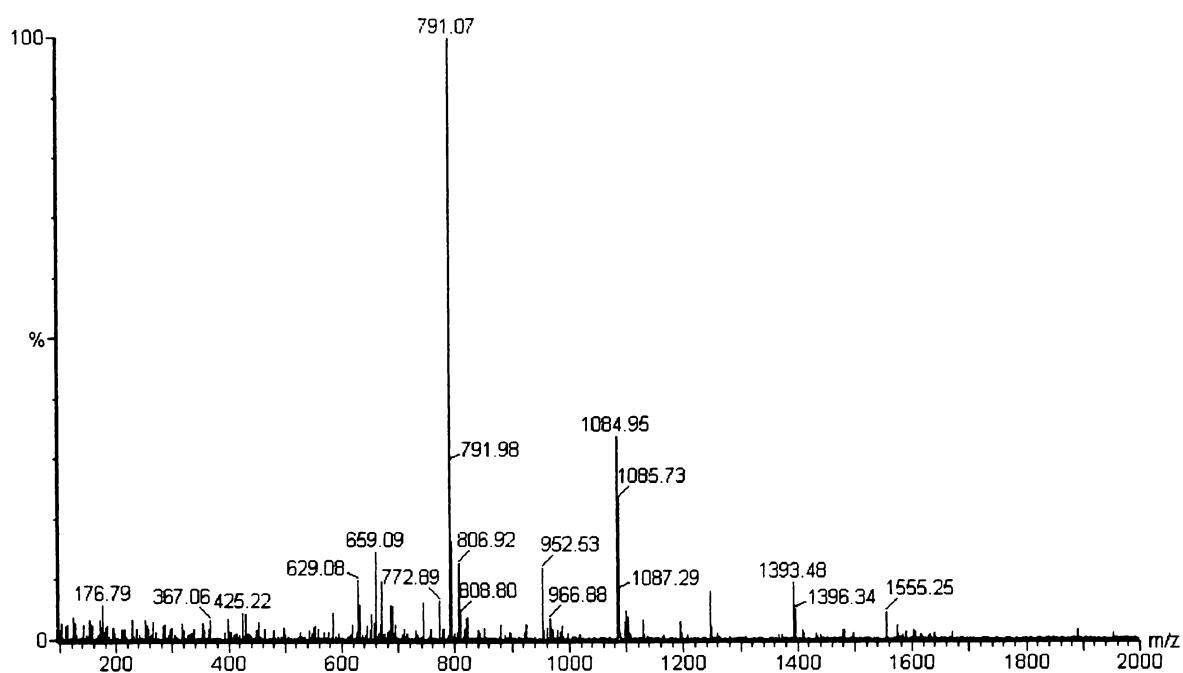


Figura 49. Espectro de ESI-MS da fração oligossacarídica H_{XG-4} (modo positivo).

5.4. Ensaio biológicos em células humanas

Oligossacarídeos fucosilados estão envolvidos no reconhecimento celular, sendo que o metabolismo da L-fucose livre e em glicoconjugados está alterados em várias doenças, incluindo o câncer (SANO et al., 1992; STAUDACHER et al., 1999). Considerando a importância das *N*-glicanas fucosiladas, conforme descrito na introdução deste trabalho, foram realizados testes preliminares para avaliar o efeito da xiloglucana de reserva e principalmente do polissacarídeo estrutural obtidos de *Hymenaea courbaril* sobre o crescimento de células tumorais humanas. Para isto foi utilizada a linhagem de células B16F10 (melanoma), sendo avaliado seu crescimento na ausência (controle) e na presença do polissacarídeo das sementes (XG-S), polissacarídeo das folhas (XG-F), bem como dos mesmos submetidos à hidrólise com celulase de *Trichoderma viride* (MEGAZYME), sendo estas frações de oligossacarídeos chamadas de H_{XG-S} e H_{XG-F}, respectivamente. Os resultados estão apresentados na Figura 50.

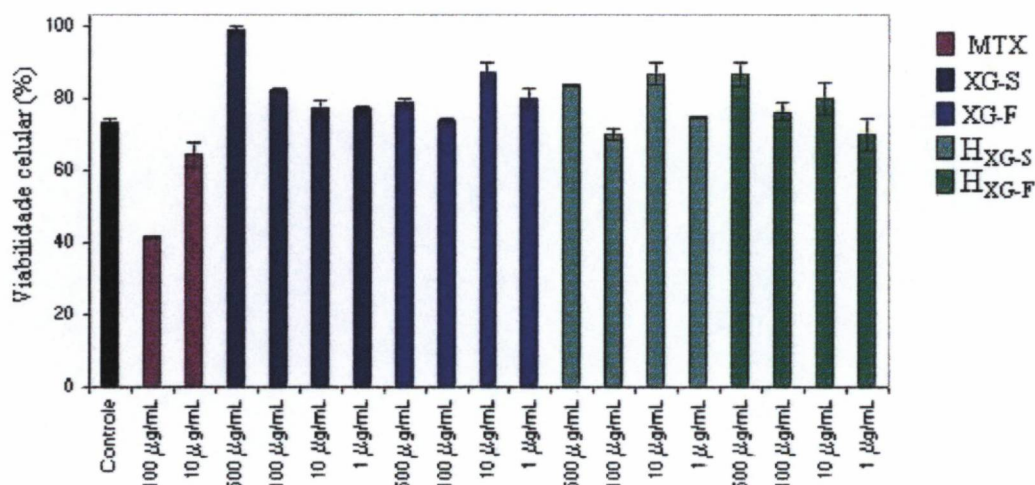


Figura 50. Avaliação do crescimento de células tumorais humanas B16F10 (melanoma) pelo método colorimétrico MTT. As células foram crescidas por 24 horas na ausência (controle) e na presença da xiloglucanas de sementes (XG-S) e folhas (XG-F), dos oligossacarídeos das sementes (H_{XG-S}) e das folhas (H_{XG-F}) em concentrações de 1 a 500 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado a droga metotrexato (MTX). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm dp$).

Como pode ser observado na Figura 50, não ocorreu inibição do crescimento das células tumorais quando crescidas na presença das xiloglucanas bem como dos seus oligossacarídeos. As células crescidas na presença dos açúcares apresentaram crescimento

igual ou superior àquele obtido com o controle, sendo que as aquelas crescidas com o polissacarídeo da semente (fração XG-S) na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram crescimento celular $\sim 20\%$ maior do que o obtido com o controle. Kato et al. (2001) testaram o efeito de xiloglucanas de diferentes fontes, bem como dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática, sobre o crescimento de células tumorais humanas COLO 201. O crescimento celular foi reduzido pelos polissacarídeos e oligossacarídeos contendo fucose. No entanto, as concentrações utilizadas (2 mg/mL) foram muito elevadas.

As amostras XG-F, XG-S, H_{XG-S} e H_{XG-F} também foram avaliadas quanto ao efeito sobre a proliferação de células esplênicas cultivadas por 72 horas. Para isto foram utilizadas células totais de baço de animais BALB/c nu/nu, cultivadas com as amostras na presença ou na ausência do anticorpo anti-CD3. O antígeno CD-3 está fisicamente estreitamente associado ao receptor de antígeno dos linfócitos T (TCR) localizados na superfície celular, e participa da transdução de sinais decorrente da ligação do antígeno ao seu receptor. A incubação de células T com anticorpo anti-CD3 induz a proliferação celular (CRUSE e LEWIS, 1999). Os resultados estão apresentados na Figura 51.

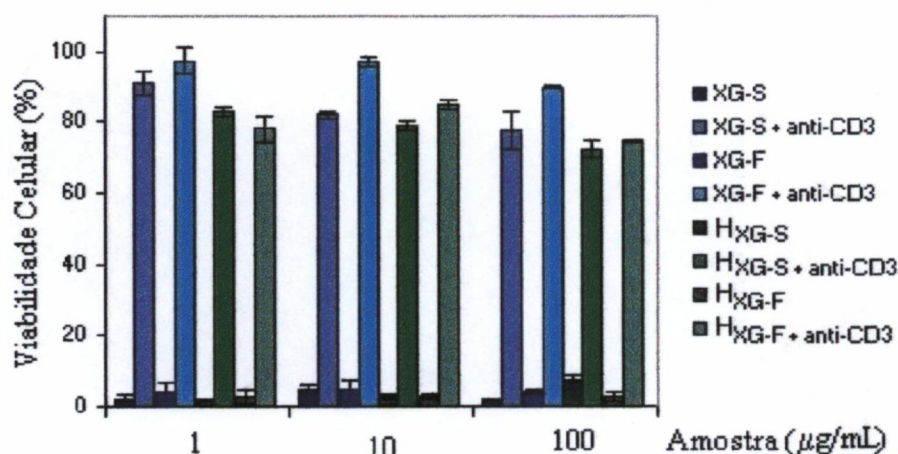


Figura 51. Determinação da viabilidade células esplênicas, através do método do MTT. As células foram incubadas por 72 horas com as amostras: xiloglucanas de sementes (XG-S) e folhas (XG-F), dos oligossacarídeos das sementes (H_{XG-S}) e das folhas (H_{XG-F}) em concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, na presença ou ausência do anticorpo anti-CD3. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm dp$).

Como pode ser observado na Figura 51, não ocorreu indução da proliferação das células incubadas com as amostras na ausência do anticorpo anti-CD3, bem como não houve inibição da proliferação celular quando os linfócitos T foram incubados com o anticorpo.

5.5. Ensaio biológico em células vegetais

Sabe-se que a atividade anti-auxínica do oligossacarídeo XXFG (YORK, DARVILL, ALBERSHEIM, 1984) depende principalmente da unidade de α -L-fucose em posição terminal (McDOUGALL e FRY, 1989), visto que oligômeros sem fucose, tais como o XXXG e o XXLG, não apresentam esta atividade inibitória. Mas somente a fucose não é suficiente para desencadear a atividade biológica, a cadeia lateral L-Fucp- α -(1 $\rightarrow$ 2)-D-Galp- β -(1 $\rightarrow$) parece ser determinante para a inibição da atividade anti-auxínica (McDOUGALL e FRY, 1989). Estes resultados sugerem a presença de receptores altamente específicos para estas oligossacarinas nas células das plantas (ALDINGTON, McDOUGALL, FRY, 1991). Dunand et al. (2000) observaram a afinidade entre proteínas da membrana plasmática isolada de protoplastos de *Rubus fruticosus* e o dissacarídeo α -L-Fuc (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$).

Por outro lado, a regulação da degradação das xiloglucanas na parede celular parece estar relacionada com a modulação da atividade de hidrolases. Foi observado que a mobilização de xiloglucanas em sementes coincide com o aumento dos níveis de enzimas hidrolíticas: XET, α -D-xilosidase, β -D-galactosidase e β -D-glucosidase (EDWARDS et al., 1986). Além disso, conforme já relatado anteriormente, Vargas-Rechia et al. (1998) observaram que os oligossacarídeos obtidos por hidrólise da xiloglucana de sementes de *H. courbaril*, apresentaram efeitos na indução de glico-hidrolases em protoplastos de *R. fruticosus*, obtendo-se a resposta mais significativa para a atividade da α -L-fucosidase induzida pelo oligossacarídeo XXLG.

Estes resultados estimularam a realização de ensaios para a identificação da ligação entre o oligossacarídeo fucosilado XLFG obtido da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* e proteínas de membrana plasmática de *R. fruticosus*, bem como ensaios para as atividades α -D-xilosidase, β -D-galactosidase e α -L-fucosidase a partir destes protoplastos, incubados ou não com o decassacarídeo XLFG.

5.5.1. Ligação do oligossacarídeo XLFG à proteínas de membrana

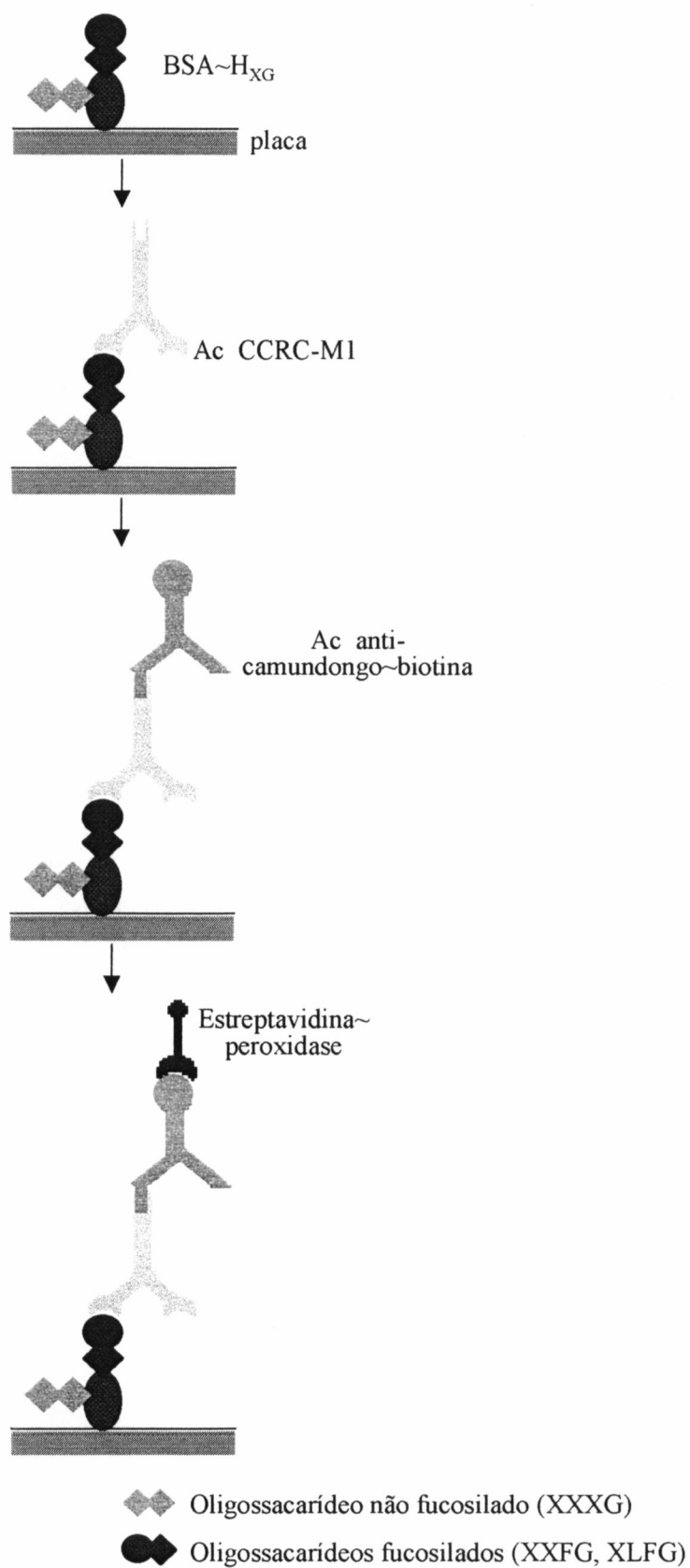
A afinidade do oligossacarídeo XLFG com proteínas de membrana foi determinada através de testes ELISA. Com o objetivo de se produzir anticorpos α -oligossacarídeos de xiloglucana foi realizada a preparação de neoglicoproteínas. Os oligossacarídeos da fração H_{XG-F} , obtidos por hidrólise enzimática das xiloglucanas de folhas de *Hymenaea courbaril*, foram acoplados a BSA, segundo o método descrito por Gray (1978) e modificado por Roy, Katzenellenbogen e Jennings (1984). O acoplamento dos oligossacarídeos a BSA ocorreu através da aminação reductiva dos açúcares redutores a resíduos de lisina da proteína, catalisada por cianoborodireto. A neoglicoproteína BSA- H_{XG-F} foi utilizada também para padronizar as condições experimentais dos ensaios de ELISA, utilizando o anticorpo α -fucose CCRC-M1 (PUHLMANN et al., 1994).

O acoplamento oligossacarídeo~BSA foi monitorado por TLC, e a quantidade de açúcar conjugado a BSA foi determinada pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A neoglicoproteína BSA- H_{XG-F} continha ~ 52 mol de oligossacarídeo por mol de BSA, correspondendo a uma eficiência de acoplamento de 88%, assumindo que a BSA contém 59 resíduos de lisina. Roy, Katzenellenbogen e Jennings (1984) obtiveram 93% de eficiência de acoplamento de lactose a BSA a 37 °C e praticamente a derivatização completa de BSA por lactose (58 mol de lactose por mol de BSA) a 50 °C. Sone, Misaki e Shibata (1989) conseguiram somente 17% de eficiência de acoplamento na incorporação de isoprimerose a BSA, utilizando outra metodologia em que os oligossacarídeos derivatizados a β -(*p*-aminofenil)etilamina são acoplados à proteína via seus sais de diazônio (ZOPF, TSAI, GINSBERG, 1978).

O soro obtido dos animais imunizados com a neoglicoproteína BSA- H_{XG-F} , apresentou especificidade contra BSA e as neoglicoproteínas, mas não reconheceu os oligossacarídeos. Como não foi possível obter anticorpos anti-oligossacarídeos da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril*, os ensaios de interação destes oligossacarídeos com proteínas de membrana de *Rubus fruticosus* foram realizados utilizando-se o anticorpo monoclonal CCRC-M1 (PUHLMANN et al., 1994). Este anticorpo reconhece unidades de fucose terminais ligadas α -(1→2) a unidades de galactose, epítipo encontrado nas cadeias laterais das xiloglucanas estruturais (FRESHOUR et al., 2003).

A padronização das condições dos ensaios de ELISA para a identificação de interação entre oligossacarídeos fucosilados relacionados as xiloglucanas e proteínas de membrana plasmática foram realizadas utilizando-se, primeiramente, a neoglicoproteína $H_{XG-F} \sim BSA$ para o revestimento dos poços (Esquema 2), sendo estes resultados apresentados na Figura 52. Os experimentos foram realizados em tampão carbonato 0,2 mol/L (pH 9,8) ou tampão PBS (10 mmol/L, pH 7,4), sendo obtidos os mesmos resultados com ambos. Para se determinar a concentração ideal de oligossacarídeo necessária para a interação com o anticorpo CCRC-M1, foram testadas várias concentrações da neoglicoproteína basendo-se no teor de açúcar total.

Nas concentrações de até 200 nmol/L não foi possível detectar a ligação do anticorpo CCRC-M1 aos oligossacarídeos fucosilados ligados a BSA. No entanto, utilizando-se um revestimento de neoglicoproteína com concentração de açúcar total de 2 μ mol/L, o anticorpo CCRC-M1 reconheceu a neoglicoproteína, sendo observados valores de absorbância cinco vezes maiores do que aqueles obtidos com as concentrações mais baixas. Deve-se considerar que a concentração de oligossacarídeos fucosilados na fração H_{XG-F} é em torno de 58%, o que resulta em uma concentração aproximadamente um terço menor de oligossacarídeos presentes na neoglicoproteína capazes de serem reconhecidos pelo anticorpo monoclonal. Os controles utilizados demonstraram que não ocorreu ligação inespecífica entre IgG~biotina e os oligossacarídeos da neoglicoproteína e interação entre CCRC-M1 e BSA, quando esta foi utilizada para revestimento das placas.



Esquema 2. Procedimento do ensaio imuno-enzimático realizado para avaliar a eficiência do anticorpo monoclonal murino CCRC-M1 em reconhecer a neoglicoproteína H_{XG-F} ~ BSA.

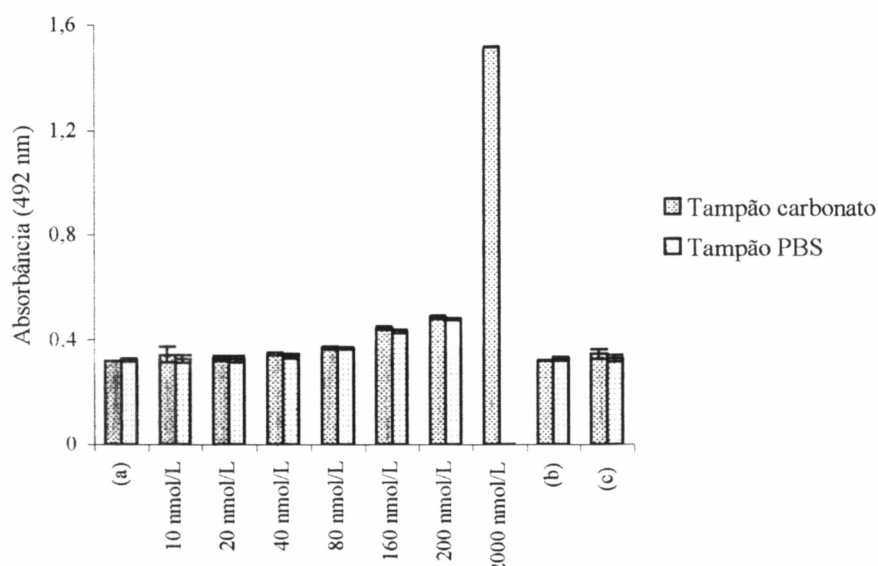
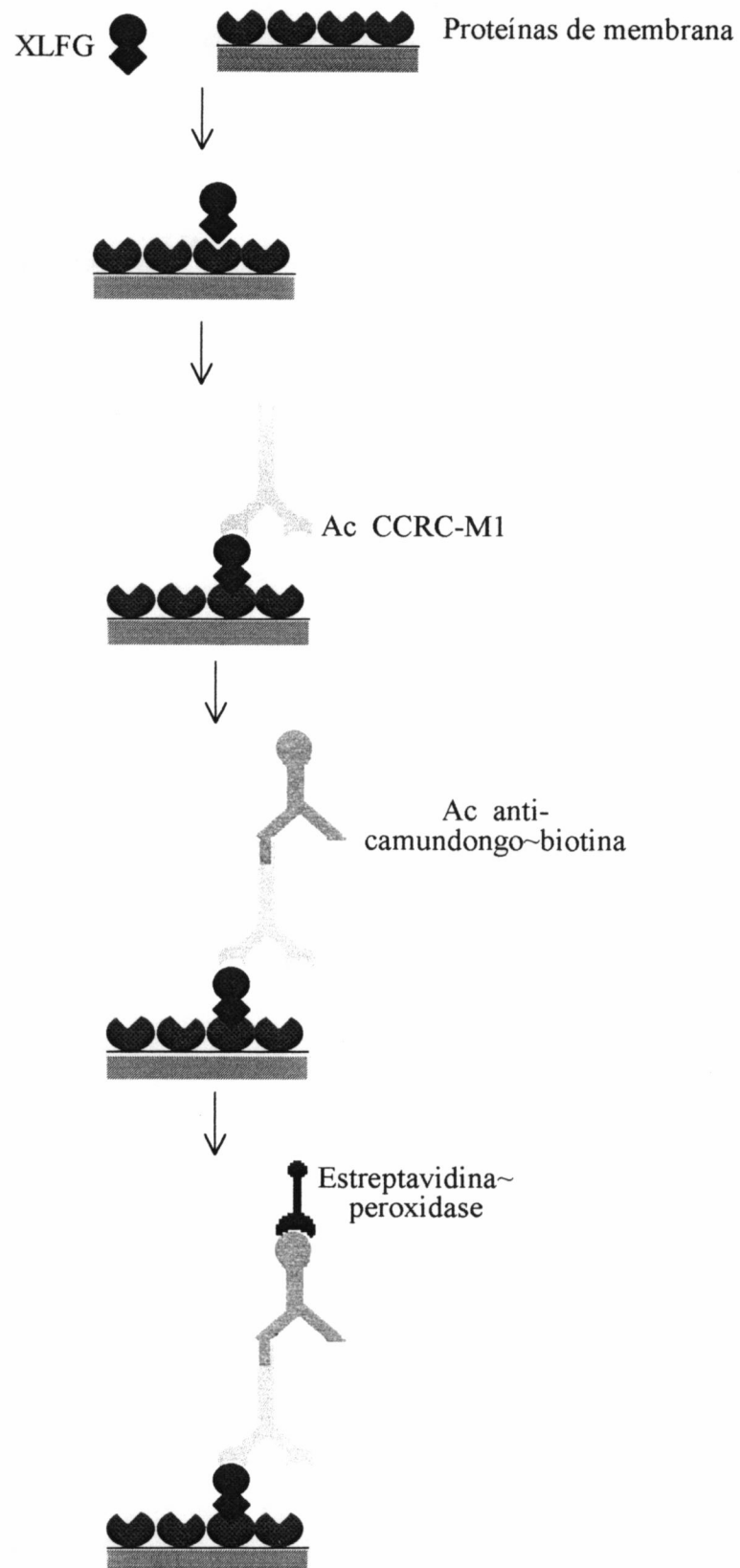


Figura 52. Teste da eficiência do anticorpo monoclonal murino CCRC-M1 em reconhecer a neoglicoproteína $H_{XG-F} \sim BSA$, em concentrações de 10 a 2000 nmol/L. A reação antígeno-anticorpo foi quantificada por ELISA, utilizando-se anticorpo secundário α -camundongo~biotina e estreptovidina marcada com peroxidase, em tampão carbonato 0,2 mol/L (pH 9,8) ou tampão PBS (10 mmol/L, pH 7,4). As concentrações foram determinadas a partir do teor de açúcar total da neoglicoproteína. Os controles foram: (a) sem a neoglicoproteína, utilizando como revestimento BSA e com anticorpo CCRC-M1, (b) com a neoglicoproteína e sem CCRC-M1 e (c) sem a neoglicoproteína, utilizando como revestimento BSA, com 200nmol/L da fração H_{XG-F} e com o anticorpo CCRC-M1. Os outros reagentes não foram alterados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm dp$).

Em seguida, foi realizado o experimento para se determinar a possível interação entre o oligossacarídeo XLFG e receptores de membrana de *Rubus fruticosus* (Esquema 3), sendo os resultados apresentados na Figura 53. Neste, foram utilizadas proteínas de membranas isoladas da fração microsomal, obtidas a partir de células em suspensão de *Rubus fruticosus*, retiradas na fase exponencial de crescimento, após 18 dias de replicação. Foram obtidas 1,76 mg de proteínas de membrana. O oligossacarídeo XLFG foi utilizado em concentrações de até 100 μ mol/L



Esquema 3. Procedimento do ensaio imuno-enzimático realizado para testar a possível ligação do oligossacarídeo XLFG às proteínas de membrana plasmática de *Rubus fruticosus*.

Pode-se observar na Figura 53 que ocorreu a ligação do oligossacarídeo XLFG na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ com proteínas de membrana. Puhlmann et al. (1994), em ensaios de ligação competitivos, utilizando diferentes oligossacarídeos de xiloglucana, observaram que os oligossacarídeos GGFG, FG apresentaram afinidade pelo anticorpo CCRC-M1 duas e três vezes menor do que o XXFG, respectivamente. O trissacarídeo $\alpha\text{-Fuc}(1\rightarrow2)\beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\text{Glc}$ e o dissacarídeo $\alpha\text{-Fuc}(1\rightarrow2)\text{-Gal}$ foram os competidores menos eficientes, enquanto que os oligossacarídeos XXXG, XLXG e XXLG foram incapazes de competir pelo sítio de ligação do anticorpo. É importante ressaltar que o anticorpo CCRC-M1, não testado anteriormente por Puhlmann et al. (1994), foi capaz de reconhecer o oligossacarídeo XLFG, indicando que a presença da galactose na posição **b** não afetou a interação do antígeno com o sítio de ligação do receptor.

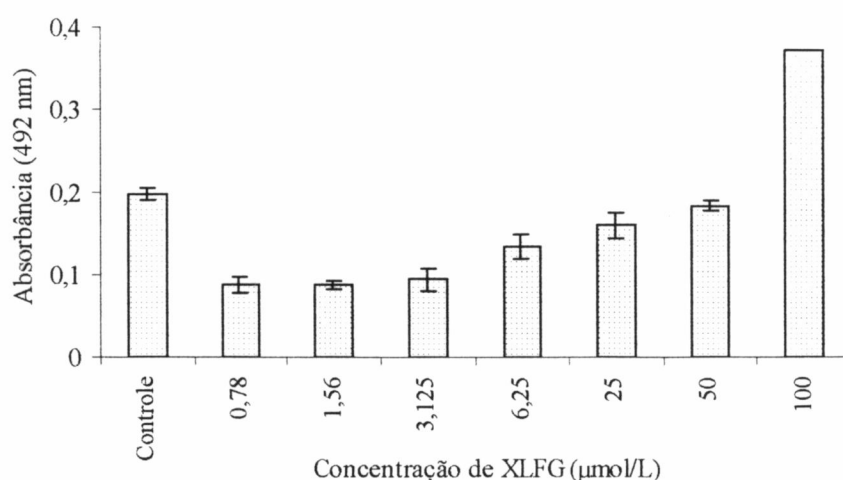


Figura 53. Ligação do oligossacarídeo XLFG à proteínas de membrana plasmática de *Rubus fruticosus*. Os complexos açúcar-proteína foram quantificados por testes ELISA, utilizando-se anticorpo monoclonal murino CCRC-M1, anticorpo secundário anti-camundongo~biotina e estreptovidina marcada com peroxidase. Como controle foi utilizado o recobrimento (proteínas de membrana) na ausência de CCRC-M1 e na presença do anticorpo secundário. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm dp$).

Por outro lado, as unidades de fucose provavelmente foram importantes para interação do decassacarídeo XLFG com o seu receptor (Figura 53), visto que Dunand et al. (2000) observaram que o oligossacarídeo XXLG e os monossacarídeos Me-Xyl e Me-Gal não foram capazes de competir com a neoglicoproteína $\alpha\text{-L-Fuc}(1\rightarrow2)\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-D-Glc}$ pela interação com o receptor. No entanto, o anticorpo CCRC-M1 foi capaz de reconhecer o oligossacarídeo fucosilado. Isto confirma os resultados obtidos por Puhlmann et al. (1994),

que concluíram que a interação dos oligossacarídeos de xiloglucana com o sítio de ligação no anticorpo não ocorre especificamente com a unidade de fucose e sim devido à conformação adotada pelos oligossacarídeos fucosilados.

Com relação à alta concentração necessária para a ligação do XLFG a proteínas de membrana (Figura 53), Dunand et al. (2000) testaram a habilidade de diversos açúcares, tais como o XXFG, metil α -L-Fuc(1→2) β -D-Gal, metil α -L-Fuc(1→2) β -D-Gal(1→2) α -D-Xyl, de competir com a neoglicoproteína metil α -L-Fuc(1→2) β -D-Gal(1→2) β -D-Glc~BSA~Biotina (10 nmol/L). As concentrações dos competidores necessárias para desfazer a interação da neoglicoproteína com as proteínas de membrana foram superiores a 92 μ mol/L.

O controle realizado com as proteínas de membrana sem oligossacarídeo XLFG, apresentou valores de absorbância superiores àqueles obtidos para o decassacarídeo XLFG a 50 μ mol/L. Estes resultados indicam uma possível interação entre as proteínas de membrana de *Rubus fruticosus* e o anticorpo CCRC-M1. No entanto, Puhlmann et al. (1994) verificaram por imunensaio *in vitro* a especificidade deste anticorpo pelo epítipo α -L-Fuc(1→2) β -D-Gal, presente nas cadeias laterais das xiloglucanas e em menor extensão nas ramnagalacturonanas do tipo I. Outras macromoléculas fucosiladas, tais como ramnagalacturonanas do tipo II, arabinogalactanas e glicoproteínas, não são reconhecidas.

4.5.2. Efeito do oligossacarídeo XLFG sobre a atividade de hidrolases.

A regulação da degradação das xiloglucanas na parede celular parece estar relacionada com a modulação da atividade de hidrolases. Foi observado que a mobilização de xiloglucanas em sementes coincide com o aumento dos níveis de enzimas hidrolíticas: XET, α -D-xilosidase, β -D-galactosidase e β -D-glucosidase (EDWARDS et al., 1986). Por isso, as atividades enzimáticas α -D-xilosidase, β -D-galactosidase e α -L-fucosidase foram determinadas a partir de protoplastos de *R. fruticosus*, incubados ou não com o decassacarídeo XLFG (Figura 54). A quantidade de proteína extraída, a partir dos protoplastos tratados ou não com o oligossacarídeo em cada uma das concentrações utilizadas, variou entre 70-100 μ g, determinada a partir do teor de proteínas dosado pelo método de Bradford (1976).

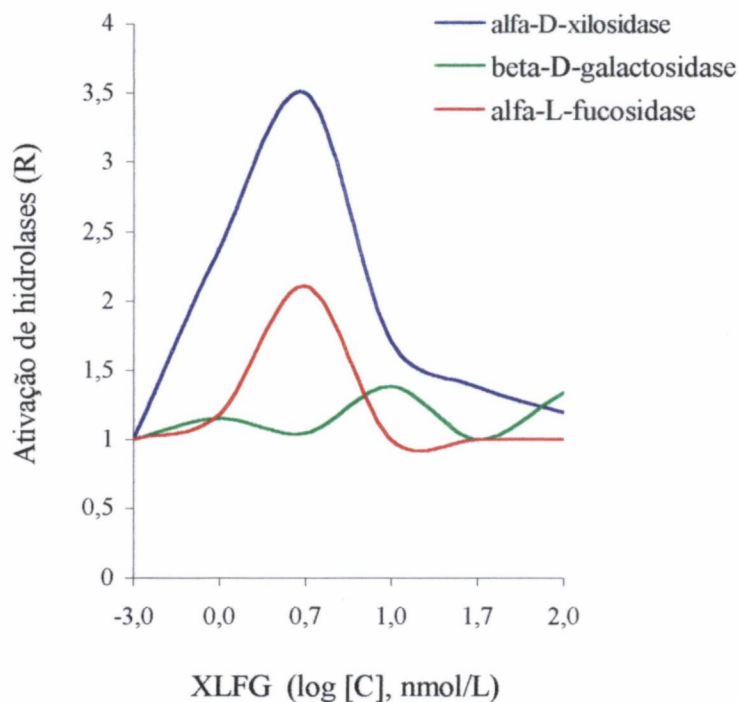


Figura 54. Curva de dose dependência para a ativação da α -D-xilosidase, β -D-galactosidase e α -L-fucosidase, induzida em protoplastos de *Rubus fruticosus*, pelo decassacarídeo XLFG, em concentrações até 100 nmol/L.

A curva de dose dependência (Figura 54) para a atividade da α -D-xilosidase e α -L-fucosidase mostra que o oligossacarídeo XLFG induziu estas enzimas, sendo a atividade máxima obtida a uma concentração de 5 nmol/L. O efeito do oligossacarídeo XLFG sobre a β -D-xilosidase também foi avaliado. Ocorreu aumento da atividade, mas somente a partir de 10 nmol/L ($R = 3,5$) de oligossacarídeo. Além disso, a máxima indução da enzima foi observada apenas com altas concentrações do XLFG (100 nmol/L, $R_{\max} = 2,7$). Na Figura 54 pode-se observar também que o decassacarídeo XLFG foi inativo quanto à indução da β -D-galactosidase. Vargas-Rechia (1998) testou os oligossacarídeos XXLG e XXXG sobre a atividade desta enzima em protoplastos da mesma espécie, também não observando uma indução significativa.

Tiné, Cortelazzo e Buckeridge (2000) salientaram o papel da β -D-galactosidase durante a degradação das xiloglucanas em sementes, em seu modelo proposto para a degradação *in vivo* de xiloglucanas de reserva. Neste o polissacarídeo é primeiramente hidrolisado pela XET, caracterizando o período de transglicosilação. Somente após a hidrólise de certas unidades de galactose dos oligossacarídeos XLXG e XLLG (desgalactosilação), os oligossacarídeos remanescentes XXLG e XXXG, entram no ciclo final de degradação em que

a glucose e a xilose são atacadas por β -glucosidase e α -xilosidase para produzir os monossacarídeos. Além disso, Tiné, Lima e Buckeridge (2000) observaram que as cadeias laterais galactosiladas modulam a ação da celulases em xiloglucanas da reserva, sendo que a presença de β -galactosidase evita o acúmulo de fragmentos de xiloglucana constituídos por 2 ou 3 oligossacarídeos. É possível que a atividade β -D-galactosidase possa ser modulada por outros fatores, sinérgicos ou independentes dos oligossacarídeos de xiloglucana.

Nas Figuras 55 e 56, o efeito do oligossacarídeo XLFG, sobre a atividade das enzimas α -D-xilosidase e α -L-fucosidase respectivamente, é comparado aos resultados obtidos anteriormente para outros oligossacarídeos (VARGAS-RECHIA, 1998).

Na Figura 55 pode-se observar que a concentração do nonassacarídeo XXFG em que se obteve a indução máxima da α -D-xilosidase (10 nmol/L, $R_{\max} = 3$) foi 5 vezes maior do que a concentração de XLFG (5 nmol/L, $R_{\max} = 3,5$) necessária para a máxima ativação. A ativação máxima induzida pelo trissacarídeo fucosil-lactose foi obtida com uma alta concentração (100 nmol/L), enquanto que o oligossacarídeo não fucosilado XXLGoI foi inativo. O oligossacarídeo XXXG também foi testado, sendo que não apresentou indução significativa desta enzima. A partir destes resultados pode-se sugerir que a ativação da α -D-xilosidase é dependente da presença da unidade de fucose na cadeia lateral (FANUTTI, GIDLEY e REID, 1996). É importante destacar que a presença da galactose na posição **b**, não alterou o efeito do XLFG na indução enzimática.

Com relação à indução da enzima α -L-fucosidase (Figura 56), o oligossacarídeo XLFG, a 5 nmol/L, não foi tão efetivo ($R_{\max}=2$) quanto os oligossacarídeos XXXG, XXFG e XXLG ($R_{\max}=3$), nas concentrações de 0,1, 1 e 10 nmol/L, respectivamente. O mesmo ocorreu com o trissacarídeo metil α -L-Fuc(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Xyl, sendo que neste caso a máxima ativação ocorreu com 10 nmol/L de oligossacarídeo. Os resultados obtidos por Vargas-Rechia et al. (1998), bem como os observados com o decassacarídeo XLFG, indicam que a presença de fucose não é relevante para se alcançar o efeito biológico neste caso. Deve-se observar que os três oligossacarídeos mais efetivos, XXXG, XXFG, XXLG, não apresentam substituição na posição **b**. Estes resultados indicam que possivelmente a ativação da α -L-fucosidase está relacionada ao motivo estrutural “XX”.

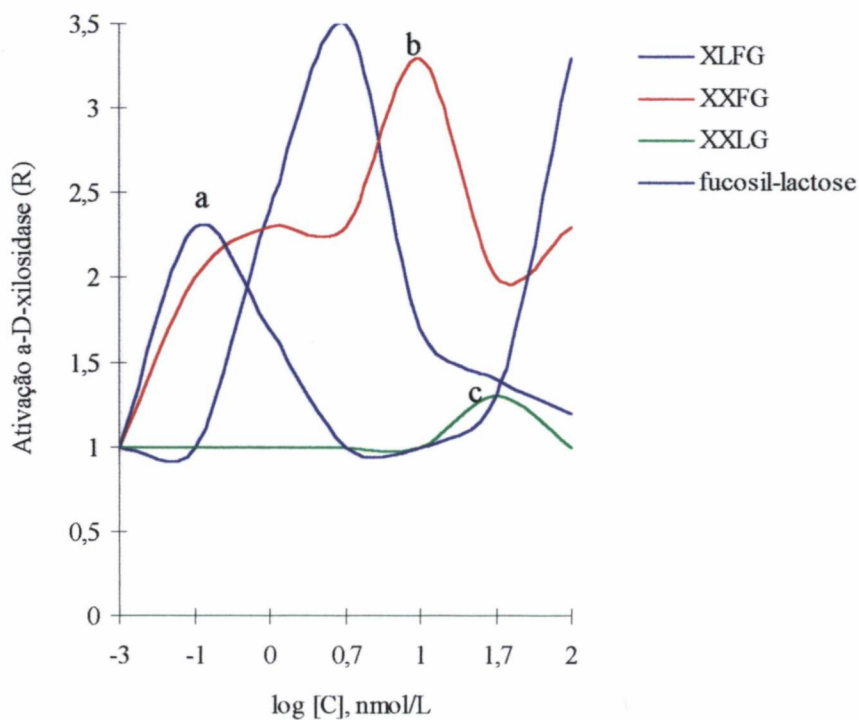


Figura 55. Efeito do oligossacarídeo XLFG sobre a indução da α -D-xilosidase comparado às curvas de dose dependência (a,b,c) obtidas anteriormente (VARGAS-RECHIA, 1998) para outros oligossacarídeos de xiloglucana.

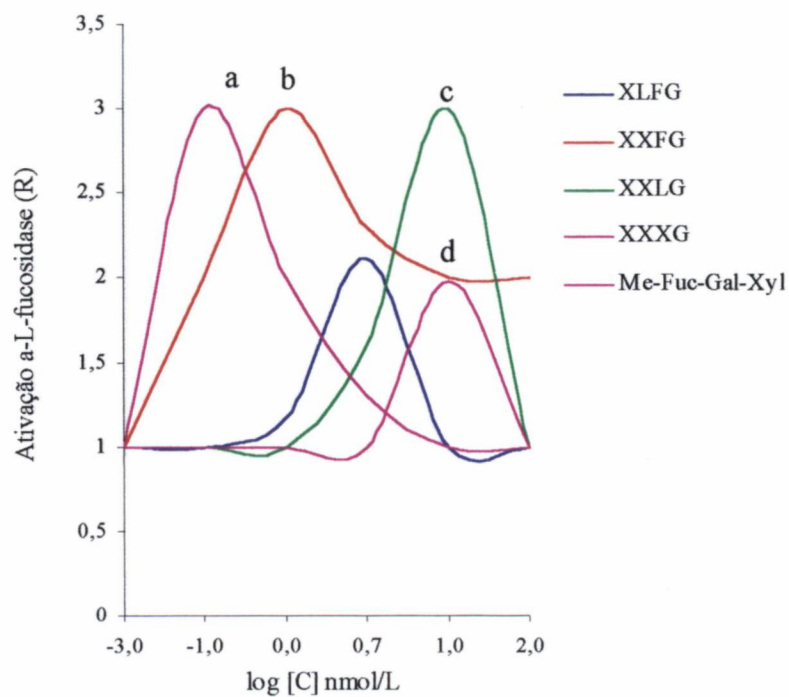


Figura 56. Efeito do oligossacarídeo XLFG sobre a indução da α -L-fucosidase comparado às curvas de dose dependência (a,b,c,d) obtidas anteriormente (VARGAS-RECHIA et al., 1998) para outros oligossacarídeos de xiloglucana. Me-Fuc-Gal-Xyl (metil α -L-Fuc(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Xyl).

Ao contrário do observado para a α -D-xilosidase, em que a presença da galactose na posição **b** do oligossacarídeo XLFG matem a ativação enzimática, para a α -L-fucosidase esta substituição foi importante, tornando este oligossacarídeo menos efetivo. Por outro lado, o oligossacarídeo XXFG, que é fucosilado e apresenta o motivo estrutural “XX” foi capaz de ativar ambas as enzimas. Estes resultados indicam que a interação molécula sinalizadora e seu receptor é altamente específica, desencadeando seqüências de transdução de sinais, que levam a diferentes respostas celulares.

VI. CONCLUSÕES

A xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* apresenta unidades de xilose com substituição em O-2 e O-4. Através da RMN bidimensional foi observado que provavelmente a substituição na posição 4 aparece nas unidades ligadas a cadeia lateral fucosil-galactose. A presença destas unidades de xilose substituídas em O-4 nesta preparação homogênea da xiloglucana de folhas de *Hymenaea courbaril* não é usual, e indica uma nova galactosil transferase participando da biossíntese da xiloglucana.

Os gráficos de $R_G \times M_w$ para as xiloglucanas de folhas e sementes de *Hymenaea courbaril*, determinados por HPSEC, apresentaram inclinações da reta que indicam conformação em bastão e emaranhado ao acaso, respectivamente. Na determinação do índice de polidispersão destes polissacarídeos foi observado que a xiloglucana estrutural é mais polidispersa.

O polissacarídeo estrutural hidrolisado enzimaticamente apresentou uma fração não totalmente hidrolisada (HXG-1; 1,5 %). A análise dos acetatos de alditóis demonstrou que esta fração apresenta maiores proporções relativas de galactose e fucose em relação ao polissacarídeo, indicando que em HXG-1 predominam cadeias laterais galactosiladas e fucosiladas. A análise por HPAEC-PAD e ESI-MS do produto de hidrólise enzimática da xiloglucana estrutural demonstrou que 90% do polissacarídeo é composto pelos oligossacarídeos XXXG, XLFG e XXFG, em proporção de 1,3: 1,3: 1,0. A alta proporção do oligossacarídeo XLFG difere do esperado para xiloglucanas de parede celular primária do tipo I.

No oligossacarídeo XLFG foi observado a substituição em O-2 nas unidades de xilose ligadas a galactose e em O-4 naquelas que apresentam ligação com o dissacarídeo fucosil-galactose, confirmando os resultados obtidos com o polissacarídeo.

Os polissacarídeos intactos e os oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática da xiloglucana das sementes e das folhas foram testados quanto ao efeito sobre a linhagem tumoral humana B16F10 (melanoma) e sobre a proliferação de células esplênicas. As amostras testadas não apresentaram citotoxicidade sobre as células tumorais, nem induziram a proliferação dos linfócitos T.

O decassacarídeo XLFG, na concentração de 100 mmol/L, apresentou interação com proteínas isoladas da membrana plasmática de protoplastos de *Rubus fruticosus*, conforme observado por testes ELISA, utilizando-se o anticorpo monoclonal de murina CCRC-M1. Estes resultados indicam a presença de receptores para o decassacarídeo na membrana de *Rubus fruticosus*.

A atividade da α -D-xilosidase, bem como da α -L-fucosidase, determinada em mistura protéica extraída de protoplastos de *Rubus fruticosus*, foi induzida pelo decassacáideo XLFG, sendo a ativação máxima obtida na concentração de 10 nmol/L.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 269-276, 1965.
- ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. **Scient. Am.**, v. 232, p. 80-94, 1975.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; O'NEILL, M.A.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: VISSER, J.; VORAGEN, A.G.J. **Progress in Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1996. p. 47-55. (Pectins and Pectinases, v. 14).
- ALDINGTON, S.; McDOUGALL, G.J.; FRY, S.C. Structure-activity-relationships of biologically-active oligosaccharides. **Plant Cell Environ.**, v. 14, n. 7, p. 625-636, 1991.
- ANTOSIEWICZ, D.M.; PURUGGANAN, M.M.; POLISENSKY, D.H.; BRAAM, J. Cellular localization of *Arabidopsis* xyloglucan endotransglycosylase-related proteins during development and after wind stimulation. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 1319-1328, 1997.
- ARRIBAS, A.; REVILLA, G.; ZARRA, I.; LORENCES, E.P. Changes in cell wall polysaccharides during the growth of *Phaseolus vulgaris* leaves. **J. Exp. Bot.**, v. 42, n. 242, p. 1181-1187, 1991.
- ARTAVIA, D. A flavonol rhamnoside from *Hymenaea courbaril* leaves. **Fitoterapia**, v. 66, n. 1, p. 91-92, 1995.
- AUGUR, C.; STIEFEL, V.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P.; PUIGDOMENECH, P. Molecular cloning and pattern of expression of an α -L-fucosidase gene from pea seedlings. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 42, p. 24839-24843, 1995.
- BABA, K.; SONE, Y.; MISAKI, A.; HAYASHI, T. Localization of xyloglucan in the macromolecular complex composed of xyloglucan and cellulose in pea stems. **Plant Cell Physiol.**, v. 35, p. 439-444, 1994.
- BARRACHINA, C.; LORENCES, E.P. Xyloglucan endotransglycosylase activity in pine hypocotyls. Intracellular localization and relationship with endogenous growth. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 102, p. 55-60, 1998.
- BAUER, W.D.; TALMADGE, K.W.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 174-187, 1973.
- BAUREITHEL, K.; FELIX, G.; BOLLER, T. Specific high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes, competitive inhibition of binding by derivatives of chitin

- fragments and a node factor of *Rhizobium*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 17932-17938, 1994.
- BIERMANN, C.J. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C.J., MCGINNIS, G.D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. p. 27-41.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, v. 54, p. 484-489, 1973.
- BOCHICCHIO, R. **Aspectos estruturais, interações e dinâmica de crescimento da parede celular de caules de gimnospermas nativas**. Curitiba, 2003. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BRACCINI, I.; PENHOAT, H.; MICHON, V.; GOLDBERG, R. CLOCHARD, M.; JARVIS, M.C.; HUANG, Z.-H.; GAGE, D.A. Structural analysis of cyclamen seed xyloglucan oligosaccharides using cellulase digestion and spectroscopic methods. **Carbohydr. Res.**, v. 276, p. 167-181, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUCHALA, A. J.; GENOUD, T.; ROULIN, S.; SUMMERMATTER, K. Xyloglucans in different types of cotton (*Gossypium* sp.) cells. **Acta Bot. Nederl.**, v. 42, n. 2, p. 213-219, 1993.
- BUCKERIDGE, M.S., CROMBIE, H.J., MENDES, C.J.M., REID, J.S.G., GIDLEY, M.J., VIEIRA, C.C.J., 1997. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydr. Res.**, 303, 233-237.
- BUSATO, A.P. **Polissacarídeos de folhas de *Hymenaea courbaril* (jatobá)**. 1999. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Acidic xylan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. In: MATTOSO, L.H.C.; LEÃO, A.; FROLLINI, E. **Natural Polymers and Composites**. São Carlos: Embrapa, 2000. p. 157-161.
- CAMIRAND, A.; BRUMMELL, D.; MacLACHLAN, G. Fucosylation of xyloglucan: localization of the transferase in dictyosomes of pea stem cells. **Plant Physiol.**, v. 84, p. 753-756, 1987.

- CAMPBELL, P.; BRAAM, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 361-366, 1999.
- CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; FREITAS-BUCHI, D.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 29, n. 4, p.1-5, 1997.
- CARPITA, N.C.; SHEA, E. M. Linkage structure of carbohydrates by gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C.J.; MCGINNIS, G.D. **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. p. 147-216.
- CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, v. 3, p. 1-30, 1993.
- CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, Maryland, 2000, p. 52-108.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p. 274-279.
- CHESSON, A.; GORDON, A.H.; LOMAX, J.A. Methylation analysis of mesophyll, epidermis, and fibre cell-walls isolated from the leaves of perennial and Italian ryegrass. **Carbohydr. Res.**, v. 141, p. 137-147, 1985.
- CIUCANU, I.; KEREK, V. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.
- CLOUSE, S.D. Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 100, p. 702-709, 1997.
- COSGROVE, D.J. Cell wall loosening by expansins. **Plant Physiol.**, v. 118, p. 333-339, 1998.
- CRAGG, H.; WILLIAMSON, M.; YONG, E.; O'BRIEN, J.; ALHADEFF, J.; FANG-KIRCHER, S.; PASCHKE, E.; WINCHESTER, B. Fucosidosis: genetic and biochemical analysis of eight cases. **J. Med. Genet.**, v. 34, p. 105-110, 1997.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1988. 555p.

- CRUSE, J.M.; LEWIS, R.E. **Atlas of immunology**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999. 450 p.
- CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of Amazonian *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, London, v. 13, p. 294-295, 1974.
- CUTILLAS-ITURRALDE, A.; ZARRA, I.; FRY, S.C.; LORENCES, E.P. Implication of persimmon fruit hemicellulose metabolism in the softening process. Importance of xyloglucan endotransglycosilase. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 91, p. 169-176, 1994.
- CUTILLAS-ITURRALDE, A.; PEÑA, M.J.; ZARRA, I.; LORENCES, E.P. A xyloglucan from persimmon fruit cell walls. **Phytochemistry**, London, v. 48, p. 607-610, 1998.
- DARVILL, A.G.; AUGUR, C.; BERGMANN, C.; CARLSON, R.W.; CHEONG, J.-J.; EBERHARD, S.; HAHN, M.G.; LÓ, V.-M.; MARFÁ, V.; MEYER, B.; MOHNEN, D.; O'NEIL, M.A.; SPIRO, M.D.; van HALBEEK, H.; YORK, W.S.; ALBERSHEIM, P. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. **Glycobiology**, v. 2, n. 3, p. 181-198, 1992.
- DAVIS, L.M.; HARRIS, P.J.; NEWMAN, R.H. Molecular ordering of cellulose after extraction of polysaccharides from primary cell walls of *Arabidopsis thaliana*: a solid-state CP/MAS ^{13}C NMR study. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 587-593, 2002.
- DESVEAUX, D.; FAIK, A.; MacLACHLAN, G. Fucosyltransferase and the biosynthesis of storage and structural xyloglucan in developing nasturtium fruits. **Plant Physiol.**, v. 118, p. 885-894, 1998.
- DOCO, T.; WILLIAMS, P.; PAULY, M.; O'NEILL, M.A.; PELLERIN, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, v. 53, p. 253-261, 2003.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUNAND, C.; GAUTIER, C.; CHAMBAT, G.; LIENART, K. Characterization of the binding of α -L-Fuc(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Gal(1 $\rightarrow$), a xyloglucan signal, in blackberry protoplasts. **Plant Sci.**, v. 151, p. 183-192, 2000.

- EDELMANN, H. G.; FRY, S. C. Factors that affect the extraction of xyloglucan from the primary cell walls of suspension-cultured rose cells. **Carbohydr. Res.**, v. 228, p. 423-431, 1992.
- EDWARDS, M.; BOWMAN, Y.J.L.; DEA, I.C.M.; REID, J.S.G. A β -D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus*) cotyledons: purification, properties, and demonstration that xyloglucan is the natural substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n^o. 9, p. 4333-4337, 1998.
- FAIK, A.; CHILESHE, C.; STERLING, J.; MacLACHLAN, G. Xyloglucan galactosyl- and fucosyltransferase activities from pea epicotyl microsomes. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 245-254, 1997.
- FAIK, A.; DESVEAUX, D.; MacLACHLAN, G. Enzymic activities responsible for xyloglucan depolymerization in extracts of developing tomato fruit. **Phytochemistry**, London, v. 49, n. 2, p. 365-376, 1998.
- FANUTTI, C.; GIDLEY, M.J.; REID, J.S.G. Substrate subsite recognition of the xyloglucan endo-transglycosylase or xyloglucan-specific endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium (*Tropaeolum Majus* L.) seeds. **Planta**, v. 200, p. 221-228, 1996.
- FARKAS, V.; HANNA, R.; MacLACHLAN, G. Xyloglucan oligosaccharide α -L-fucosidase activity from growing pea stems and germinating nasturtium seeds. **Phytochemistry**, London, v. 30, n. 10, p. 3203-3207, 1991.
- FARKAS, V.; SULOVA, Z.; STRATILOVA, E.; HANNA, R.; MacLACHLAN, G. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 298, p. 365-370, 1992.
- FATH, A.; BOLLER, T. Solubilization, partial purification, and characterization of a binding site for a glycopeptide elicitor from the microsomal membranes of tomato cells. **Plant Physiol.**, v. 112, p. 1659-1668, 1996.
- FLORES, E.M.; BENAVIDES, C.E. Germinación y morfología de la plántula de *Hymenaea courbaril* (Caesalpinaceae). **Rev. Biol. Trop.**, v. 38, n. 1, p. 91-98, 1990.
- FLOWERS, H.M. Chemistry and biochemistry of D- and L-fucose. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 39, p. 279-345, 1981.

- FREITAS, R.A., GORIN, P.A.J., NEVES, J., SIERAKOWSKI, M.-R. A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydr. Polym.**, v. 51, p. 25-32, 2003.
- FREITAS, R.A. **Estrutura e Interações entre galactoxiloglucanas e amidos**. Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- FRESHOUR, G.; BONIN, C.P.; REITER, W.-D.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; HAHN, M.G. Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the *murl* mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 131, p. 1602-1612, 2003.
- FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **J. Exp. Bot.**, v. 40, n. 211, p. 1-11, 1989.
- FRY, S.C.; SMITH, R.C.; RENWICK, K.F.; MARTIN, D.J.; HODGE, S.K.; MATTHEWS, K.J. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. **Biochem. J.**, v. 282, p. 821-828, 1992.
- FRY, S.C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J.-P.; KATO, Y.; LORENCES, E.P.; MacLACHLAN, G.A.; McNEIL, M.; MORT, A.; REID, J.S.G.; SEITZ, H.U.; SELVENDRAN, R.R.; VORAGEN, A.G.J.; WHITE, A.R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 89, p. 1-3, 1993.
- GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes. **Nature**, v. 191, p. 1295-1296, 1961.
- GAILLARD, B.D.E.; THOMPSON, N.S.; MORAK, A.J. The interaction of polysaccharides with iodine. Investigation of the general nature of the reaction. **Carbohydr. Res.**, v. 11, p. 509-519, 1969.
- GIARDINA, M.G.; MATARAZZO, M.; MORANTE, R.; LUCARIELLO, A.; VARRIALE, A.; GUARDASOLE, V.; deMARCO, G. Serum α -L-fucosidase activity and early detection of hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 83, n.12, p. 2468-2474, 1998.
- GIDLEY, M.J.; LILLFORD, P.J.; ROWLANDS, D.W.; LANG, P.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V.; EDWARDS, M.; FANUTTI, C.; REID, J.S.G. Structure and solution properties of tamarind seed polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, v. 214, p. 299-314, 1991.

- GRAY, G.R. Antibodies to carbohydrates: preparation of antigens by coupling carbohydrates to proteins by reductive amination with cianoborohydrate. **Methods Enzymol.**, v. 50, p. 155-160, 1978.
- GREEN, J.W. Wood cellulose. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 3, p. 9-21, 1963.
- GUILLÉN, R.; YORK, W.S.; PAULY, M.; AN, J.; IMPALLOMENI, G.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Metabolism of xyloglucan generates xylose-deficient oligosaccharide subunits of this polysaccharide in etiolated peas. **Carbohydr. Res.**, v. 277, p. 291-311, 1995.
- HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 34, p. 387-412, 1996.
- HANTUS, S.; PAULY, M.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P.; YORK, W.S. Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans. **Carbohydr. Res.**, v. 304, p. 11-20, 1997.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.
- HAYASHI, T.; KATO, Y.; MATSUDA, K. Xyloglucan from suspension-cultured soybean cells. **Plant Cell Physiol.**, v. 21, p. 1405-1414, 1980.
- HAYASHI, T.; WONG, Y.-S.; MacLACHLAN, G. Pea xyloglucan and cellulose. II. Hydrolysis by pea endo-1,4- β -glucanases. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 605-610, 1984.
- HAYASHI, T.; MARSDEN, M.P.F.; DELMER, D.P. Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interactions *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiol.**, v. 83, p. 384-389, 1987.
- HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.**, v. 40, p. 139-168, 1989.
- HAYASHI, T.; TAKEDA, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Effects of degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. **Plant Cell Physiol.**, v. 35, n. 6, p. 439-444, 1994a.
- HAYASHI, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Characterization of the adsorption of xyloglucans to cellulose. **Plant Cell Physiol.**, v. 35, n. 8, p. 1199-1205, 1994b.
- HEGDE, S.; MANESS, N.O. Changes in apparent molecular mass of pectin and hemicellulose extracts during peach softening. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 123, n. 3, p. 445-456, 1998.

- HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. **Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég.**, v. 14, p. 1-233, 1953.
- HETHERINGTON, P.R.; FRY, S.C. Xyloglucan endotransglycosylase activity in carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 987-992, 1993.
- HISAMATSU, M.; IMPALLOMENI, G.; YORK, W.S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. A new undecasaccharide subunit of xyloglucans with two α -L-fucosyl residues. **Carbohydr. Res.**, v. 211, p. 117-129, 1991.
- HISAMATSU, M.; YORK, W.S.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Characterization of seven xyloglucan oligosaccharides containing from seventeen to twenty glycosyl residues. **Carbohydr. Res.**, v. 277, p. 45-71, 1992.
- HOSON, T.; MASUDA, Y. Inhibition of auxin-induced elongation and xyloglucan breakdown in azuki bean epicotyl segments by fucose-binding lectins. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 82, p. 41-47, 1991.
- HOSON, T.; SONE, Y.; MISAKI, A.; MASUDA, Y. Role of xyloglucan breakdown in epidermal cell walls for auxin-induced elongation of azuki bean epicotyl segments. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 87, p. 142-147, 1993.
- HUISMAN, M.M.H.; WEEL, K.G.C.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Xyloglucan from soybean (*Glycine max*) meal is composed of XXXG-type building units. **Carbohydr. Polym.**, v. 42, p. 185-191, 2000.
- ISHIMARU, M.; KOBAYASHI, S. Expression of a xyloglucan *endo*-transglycosylase gene is closely related to grape berry softening. **Plant Science**, v. 162, p. 621-628, 2002.
- JANSSON, P.-E.; KENNE, L.; LIEDGREN, L.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analyses of carbohydrates. **Chem. Commun. Univ. Stockolm**, v. 8, p. 1-72, 1976.
- JIA, Z.; QIN, Q.; DARVILL, A.G.; YORK, W. Structure of xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. **Carbohydr. Res.**, v. 11, p. 1197-1208, 2003.
- JOHNSON, S.W.; ALHADEFF, J.A. Mammalian α -L-fucosidases. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 99B, n. 3, p. 479-488, 1991.

- JONES, H.W.; McKUSICK, V.A.; HARPER, P.S.; WU, K.D. The HeLa cell and a reappraisal of its origin. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 38, p. 945-949, 1971.
- KAKEGAWA, K.; EDASHIGE, Y.; ISHI, T. Xyloglucan from xylem-differentiating zones of *Cryptomeria japonica*. **Phytochemistry**, London, v. 47, n. 5, p. 767-771, 1998.
- KANAI R.; EDWARDS G.E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplast from C3, C4 and Crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. **Plant Physiol.**, v. 52, p. 484-490, 1973.
- KANNAGI, R.; FUKUSHI, Y.; TACHIKAWA, T.; NODA, A.; SHIN, S.; SHIGETA, K.; HIRAIWA, N.; FUKUDA, Y.; INAMOTO, T.; HAKOMORI, S.-I.; IMURA, H. Quantitative and qualitative characterization of human cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing fucosyl or sialyl-fucosyl type 2 chain polylactosamine. **Cancer Res.**, v. 46, p. 2619-2626, 1986.
- KATO, Y.; MATSUDA, K. Structure of oligosaccharides obtained by hydrolysis of mung bean xyloglucan with *Trichoderma viride* cellulase. **Agric. Biol. Chem.**, v. 44, p. 1756-1766, 1980.
- KATO, Y.; UCHIDA, J.; ITO, S.; MITSUISHI, Y. Structural analysis of the oligosaccharide units of xyloglucan and their effects on growth of COLO 201 human tumor cells. **International Congress Series**, n. 1223, p. 161-164, 2001.
- KAWASAKI, N.; OHKURA, R.; MIYAZAKI, S.; UNO, Y.; SUGIMOTO, S.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 181, n. 2, p. 227-234, 1999.
- KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K.W.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 188-197, 1973.
- KOHANSKI, R.A.; LANE M.D. Homogeneous functional insulin receptor from 3T3-L1 adipocitos. Purification using N^αB1-(Biotinyl-ε-aminocaproyl)insulin and avidin-Sepharose. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 5014-5025, 1985.
- KOKA, C.V.; CERNY, R.E.; GARDNER, R.G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CLOUSE, S.D. A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiol.**, v. 122, p. 85-98, 2000.

- KONISHI, T.; MITSUISHI, Y. KATO, Y. Analysis of oligosaccharide units of xyloglucans by digestion with isoprimerase-producing oligoxyloglucan hydrolase followed by anion-exchange chromatography. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n. 12, p. 2421-2424, 1998.
- KOOIMAN, P. Partial enzymic degradation of *Tamarindus*-amyloid. **Nature**, v. 179, p. 201, 1957.
- KOOIMAN, P. On the occurrence of amyloids in plant seeds. **Acta Bot. Neerl.**, v. 9, p. 208-219, 1960.
- KOOIMAN, P. The constitution of *Tamarindus* amyloid. **Rec. Trav. Chim. Pays-Bas**, v. 80, p. 849-865, 1961.
- KOOIMAN, P. The constitution of the amyloid from seeds of *Amona muricata*. **Phytochemistry**, London, v. 6, p. 1665-1673, 1967.
- LANCE, D.G.; JONES, J.K.N. Gas chromatography of derivatives of the methyl ethers of D-xylose. **Can. J. Chem.**, v. 45, p. 1995-1998, 1967.
- LANGENHEIM, J.H.; LINCOLN, D.E.; STUBBLEBINE, W.H.; GABRIELLI, A.C. Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioideae: Leguminosae). **Amer. J. Bot.**, v. 69, n. 4, p. 595-607, 1982.
- LARSSON, C.; WIDELL, S.; KJELLBON, P. Preparation of high-purity plasma-membrane. **Methods Enzymol.**, v. 148, p. 258-267, 1987.
- LEE, Y.E.; ZEIKUS, J.G. Genetic organization, sequence and biochemical characterization of recombinant β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 1235-1243, 1993.
- LEROUXEL, O.; CHOO, T.S.; SÉVENO, M.; USADEL, B.; FAYE, L.; LEROUGE, P.; PAULY, M. Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. **Plant Physiol.**, v. 130, p. 1754-1763, 2002.
- LEVY, S.; YORK, W.S. STUIKE-PRILL, R; MEYER, B.; STAEHELIN, L.A. Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan: the role of fucosylated side chain in surface-specific side chain folding. **Plant J.**, v. 1, p. 195-215, 1991.
- LIMA, D.U.; BUCKERIDGE, M.S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydr. Polym.**, v. 46, p. 157-163, 2001.

- LIMA, D.U.; BUCKERIDGE, M.S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydr. Polym.**, v. 53, p. 285-296, 2003.
- LIMA, D.U.; OLIVEIRA, R.C.; BUCKERIDGE, M.S. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking. **Carbohydr. Polym.**, v. 52, p. 367-373, 2003.
- LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.-R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá). **Cien. Cult.**, v. 45, n. 1, p. 22-26, 1993.
- LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.-R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan from the seeds of *Hymenaea coubaril* var. *stilbocarpa*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n. 6, p. 413-415, 1995.
- LIMA, N.N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y.G.; WILHELM, H.M.; RIBAS, L.L.F.; SIERAKOWSKI, M.-R. A xyloglucan from the seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Rep.**, v. 21, p. 402-407, 2003.
- LORENCES, E.P.; FRY, S.C. Xyloglucan oligosaccharides with at least two α -D-xylose residues act as acceptor substrates for xyloglucan endotransglycosylase and promote the depolymerisation of xyloglucan. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 88, p. 105-112, 1993.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Ed. Plantarum, 1992. p. 155.
- LOWE, J.B. Selectins ligands, leukocyte trafficking, and fucosyltransferase genes. **Kidney Int.**, v. 51, p. 1418-1426, 1997.
- LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. Caracterização de Polímeros. Determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: e-papers, 2001. 366p.
- MABUSELA, W.T.; STEPHEN, A.M.; BOTHA, M.C. Carbohydrate polymers from *Aloe ferox* leaves. **Phytochemistry**, London, v. 29, n. 11, p. 3555-3558, 1990.
- MacLACHLAN, G.; LEVY, B.; FARKAS, V. Acceptor requirements for GDP-fucose: xyloglucan 1,2- α -L-fucosyltransferase activity solubilized from pea epicotyl membranes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 294, n.1, p. 200-205, 1992.
- MADSON, M.; DUNAND, C.; LI, X.; VERMA, R.; VANZIN, G.F.; CAPLAN, J.; SHOUE, D.A.; CARPITA, N.C.; REITER, W.-D. The MUR3 gene of *Arabidopsis* encodes a

- xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. **Plant Cell**, v. 15, p. 1662-1670, 2003.
- MAGNANI, J.L.; STEPLEWSKI, Z.; KOPROWSKI, H.; GINSBURG, V. Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. **Cancer Res.**, v. 43, p. 5489-5492, 1983.
- MARRY, M.; CAVALIER, D.M.; SCHNURR, J.K.; NETAND, J.; YANG, Z.; PEZESHK, V.; YORK, W.S.; PAULY, M.; WHITE, A.R. Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. **Carbohydr. Polym.**, v. 51, p. 347-356, 2003.
- MARSAIOLI, A.J.; LEITÃO-FILHO, H. F.; CAMPELLO, J.P. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, London, v. 14, p. 1882-1883, 1975.
- MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *H. courbaril*: estrutura e propriedades**. Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MARTIN, S.; FREITAS, R.A.; OBAYASHI, E.; SIERAKOWSKI, M.-R. Physico-chemical aspects of galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* and its tetraborate complex. **Carbohydr. Polym.**, v. 54, p. 287-295, 2003.
- MARUYAMA, K.; GOTO, C.; NUMATA, M.; SUZUKI, T.; NAKAGAWA, Y.; HOSHINO, T.; UCHIYAMA, T. *O*-Acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of *Mentha*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1309-1314, 1996.
- MAURER-MENESTRINA, J.; SASSAKI, G.; SIMAS, F.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structure of highly substituted β -xylan of the gum exudate of the palm *Livistona chinensis* (Chinese fan). **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 1843-1850, 2003.
- McCANN, M.C.; ROBERTS, K.; WILSON, R.H.; GIDLEY, M.J.; GIBEAUT, D.M.; KIM, J-B; CARPITA, N.C. Old and new ways to probe plant cell-wall architecture. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. 103-113, 1995.
- McDOUGALL, G.J.; FRY, S.C. Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific nonasaccharide of xyloglucan. **Planta**, v. 175, p. 412-416, 1988.

- McDOUGALL, G.J.; FRY, S.C. Anti-auxin activity of xyloglucan oligosaccharides: the role of groups other than the terminal α -L-fucose residue. **J. Exp. Bot.**, v. 40, n. 211, p. 233-238, 1989.
- McDOUGALL, G.J.; FRY, S.C. Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. **Plant Physiol.**, v. 93, p. 1042-1048, 1990.
- McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 625-663, 1984.
- McQUEEN-MASON, S.J.; DURACHKO, D.M.; COSGROVE, D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **Plant Cell**, v. 4, p. 1425-1433, 1992.
- McQUEEN-MASON, S.J.; COSGROVE, D.J. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relation, and binding. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 87-100, 1995.
- MILLER, J.G.; FRY, S.C. Characteristics of xyloglucan after attack by hydroxyl radicals. **Carbohydr. Res.**, v. 332, p. 389-403, 2001.
- MISAWA, H.; TSUMURAYA, Y.; KANEKO, Y.; HASHIMOTO, Y. α -L-Fucosyltransferases from radish primary roots. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 665-673, 1996.
- MISHIMA, T.; HISAMATSU, M.; YORK, W.S.; TERANISHI, K.; YAMADA, T. Adhesion of β -D-glucans to cellulose. **Carbohydr. Res.**, v. 308, p. 389-395, 1998.
- MIYAZAKI, S.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; KUBO, W.; ENDO, K.; ATTWOOD, D. Comparison of *in situ* gelling formulations for the oral delivery of cimetidine. **Int. J. Pharm.**, v. 220, p. 161-168.
- MIYAZAKI, S.; SUICHA, F.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery. **J. Control Release**, v. 56, p. 75-83, 1998.
- MIYAZAKI, S.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; ENDO, K.; TAKAHASHI, A.; ATTWOOD, D. *In situ* gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. **Int. J. Pharm.**, v. 229, p. 29-36, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immun. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method from the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NISHITANI, K.; TOMINAGA, R. *In vitro* molecular weight increase in xyloglucans by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis*. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 82, p. 490-497, 1991.
- NISHITANI, K.; TOMINAGA, R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyses transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 21058-21064, 1992.
- NISHITANI, K. Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. **J. Plant Res.**, v. 108, p.137-148, 1995.
- NOSEDA, M.D. **Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetrasporofítica de *Gigartina skottsberggi* (Rhodophyta, Gigartinales)**. Curitiba, 1994. 224 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- O'NEILL, M.A.; SELVENDRAN, R.R. Structural analysis of the xyloglucan from *Phaseolus coccineus* cell-walls using cellulase-derived oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 145, p. 45-58, 1985.
- O'NEILL, M.A.; SELVENDRAN, R.R. Isolation and partial characterization of a xyloglucan from the cell walls of *Phaseolus coccineus*. **Carbohydr. Res.**, v. 111, p. 239-255, 1983.
- ONWELUZO, J.C.; RAMESH, H.P.; THARANATHAN, R.N. Characterization of free sugars and xyloglucan-type polysaccharides of two tropical legumes. **Carbohydr. Polym.**, v. 47, p. 253-257, 2002.
- OOSTERVELD, A.; HARMSSEN, J.S.; VORAGEN, A.G.J.; SCHOLS, H.A. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. **Carbohydr. Polym.**, v. 52, p. 285-296, 2003.
- PERRIN, R.M.; DeROCHER, A.E.; BAR-PELET, M.; ZENG, W.; NORAMBUENA, L.; ORELLANA, A.; RAIKHEL, N.V.; KEEGSTRA, K. Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. **Science**, v. 284, p. 1976-1979, 1999.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977.

- PRABHA, T.N.; BHAGYALAKSHMI, N. Carbohydrate metabolism in ripening banana fruit. **Phytochemistry**, London, v. 48, p. 915-919, 1998.
- PROSEUS, T.E.; ORTEGA, J.K.E.; BOYER, J.S. Separating growth from elastic deformation during cell enlargement. **Plant Physiol.**, v. 119, p. 775-784, 1999.
- PUHLMANN, J.; BUCHELI, E.; SWAIN, M.J.; DUNNING, N.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; HAHN, M.G. Generation of monoclonal antibodies against plant cell wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal α -(1 $\rightarrow$ 2)-linked fucosyl-containing epitope. **Plant Physiol.**, v. 104, p. 699-710, 1994.
- REDGWELL, R.J.; SELVENDRAN, R.R. Structural features of cell-wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. **Carbohydr. Res.**, v. 157, p.183-199, 1986.
- REDGWELL, R.J.; MELTON, L.D.; BRASCH, D.J. Cell-wall polysaccharides of ripening on the structural features of cell-wall materials. **Carbohydr. Res.**, v. 209, p.191-202, 1991.
- REDGWELL, R.J.; FRY, S.C. Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1399-1406, 1993.
- REDGWELL, R.J.; TROVATO, V.; MERINAT, S.; CURTI, D.; HEDIGER, S.; MANEZ, A. Dietary fiber in cocoa shell: characterization of component polysaccharides. **Food Chem.**, v. 81, p. 103-112, 2003.
- REID, S.; SIMS, I.M.; MELTON, L.D.; GANE, A.M. Characterization of extracellular polysaccharides from suspension cultures of apple (*Malus domestica*). **Carbohydr. Polym.**, v. 39, n. 4, p. 369-376, 1999.
- REITER, W.-D.; CHAPPLE, C.C.S.; SOMERVILLE, C.R. Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. **Science**, v. 261, p. 1032-1034, 1993.
- REITER, W.-D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Plant Biology**, v. 5, p. 536-542, 2002.
- RENARD, C.M.G.C.; LOMAX, J.A; BOON, J.J. Apple fruit xyloglucans: a comparative study of enzyme digests of whole cell walls and alkali-extracted xyloglucans. **Carbohydr. Res.**, v. 232, p. 303-320, 1992.
- RENARD, C.M.G.C.; LEMEUNIER, C.; THIBAUT, J.-F. Alkaline extraction of xyloglucan from depectinized apple pomace: optimization and characterization. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, p. 209-216, 1995.

- RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil, manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blucher, 1978. p. 124-128.
- ROSE, J.K.C.; HADFIELD, K.A.; LABAVITCH, J.M.; BENNETT, A.B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 345-361, 1998.
- ROY, E.; KATZENELLENBOGEN, E.; JENNINGS, H.J. Improved procedure for the conjugation of oligosaccharides to proteins by reductive amination. **Can. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 62, p. 270-275, 1984.
- SAKURAI, N.; NEVINS, D.J. Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp tissues. **Physiol. Plant.**, Denmark, v. 89, p. 681-686, 1993.
- SANO, M.; HAYAKAWA, K.; KATO, I. Purification and characterization of α -L-fucosidase from *Streptomyces* species. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 1522-1527, 1992.
- SARKAR, A.K.; ROSTAND, K.S.; JAIN, R.K.; MATTA, K.L.; ESKO, J.D. Fucosylation of disaccharide precursors of sialyl Lewis^x inhibit selectin-mediated cell adhesion. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 41, p. 25608-25616, 1997.
- SCHINDLER, T.M. The new view of primary cell wall. **Z. Pflanzenernähr. Bodenk.**, v. 161, p. 499-508, 1998.
- SHI, Z.R.; McINTYRE, L.J.; KNOWLES, B.B.; SOLTER, D.; KIM, Y.S. Expression of carbohydrate differentiation antigen, stage-specific embryonic antigen 1, in human colonic adenocarcinoma. **Cancer Res.**, v. 44, p. 1142-1147, 1984.
- SHIBUYA, N.; KAKU, H.; KUCHITSU, K.; MALIARIK, M.J. Identification of a novel high affinity binding site for *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. **FEBS Letter**, v. 329, p. 75-78, 1993.
- SHIBUYA, N.; MINNI, E. Oligosaccharide signaling for defence responses in plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 223-233, 2001.
- SHIGA, T.M.; LAJOLO, F.M.; FILISETTI, T.M.C.C. Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. **Food Chem.**, *in press*, 2003.
- SHPIGEL, E.; ROIZ, L.; GOREN, R.; SHOSEYOV, O. Bacterial cellulose-binding domain modulates *in vitro* elongation of different plant cells. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 1185-1194, 1998.

- SIDDIQUI, I.R.; WOOD, P.J. Structural investigation of sodium hydroxide-soluble rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 53, p. 85-94, 1977.
- SIMS, I.M., MUNRO, S.L.A., CURRIE, G., CRAIK, D., BACIC, A. Structural characterization of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydr. Res.**, 293, 147-172, 1996.
- SIMS, I.M.; GANE, A.M.; DUNSTAN, D.; ALLAN, G.C.; BOGER, D.V.; MELTON, L.D.; BACIC, A. Rheological properties of xyloglucans from different plant species. **Carbohydr. Polym.**, v. 37, p. 61-69, 1998.
- SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 6, p. 20-24, 1972.
- SMITH, R.C.; FRY, S.C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. **Biochem. J.**, v. 279, p. 529-535, 1991.
- SOMOGYI, M.A. New reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v. 160, p. 61-68, 1945.
- SONE, Y.; MISAKI, A.; SHIBATA, S. Preparation and characterization of antibodies against 6-O- α -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranose (β -isoprimeverose), the disaccharide unit of xyloglucan in plant cell-walls. **Carbohydr. Res.** v. 191, p. 79-89, 1989.
- SONE, Y.; SATO, K. Measurement of oligosaccharides derived from tamarind xyloglucan by competitive ELISA assay. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, p. 2295-2296, 1994.
- SONG, Y.H.; FENG, T.; SHEN, Y.; MA, D.J.; WANG, H.Z. Clinical application for determination of free L-FC in urine. **Progr. Biochem. Biophys.**, v. 26, n. 5, p. 511-514, 1999.
- SOUZA-LIMA, M.M.; ONO, L.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Natural and sulphated polysaccharides from Caesalpiniaceae seeds. **Latin American Applied Research**, v. 26, p. 1-6, 1996.
- SOUZA-LIMA, M.M. **Polissacarídeos nativos e modificados de sementes de *Hymenaea courbaril***. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- SPRINGER, T. A.; LASKY, L.A. Sticky sugars for selectins. **Nature**, v. 349, p. 196-197, 1991.
- SPRONK, B.A.; RADEMAKER, G.J.; HAVERKAMP, J.; THOMAS-OATES, J.E.; VINCKEN, J.-P.; VORAGEN, A.G.J.; KAMERLING, J.P.; VLIEGENTHART, J.F.G. Dimers of a GFG

- hexasaccharide occur in apple fruit xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, v. 305, p. 233-242, 1998.
- STAUDACHER, E.; ALTMANN, F.; WILSON, I.B.H.; MARZ, L. Fucose in *N*-glycans: from plant to man. **Biochim. Biophys. Acta – General subjects**, v. 1473, n. 1, p. 216-236, 1999.
- STEELE, N.M.; FRY, S.C. Purification of xyloglucan endotransglycosylases (XET): a generally applicable and simple method based on reversible formation of an enzyme-substrate complex. **Biochem. J.**, v. 340, p. 207-211, 1999.
- STEELE, N.M.; SULOVA, Z.; CAMPBELL, P.; BRAAM, J.; FARKAS, V.; FRY, S.C. Ten isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase from plant cell walls select and cleave the donor substrate stochastically. **Biochem. J.**, v. 355, p. 671-679, 2001.
- STEVENS, B.J.H.; SELVENDRAN, R.R. Hemicellulosic polymers of cabbage leaves. **Phytochemistry**, London, v. 23, n. 2, p. 339-347, 1984.
- STUBBLEBINE, W.; LANGENHEIM, J.H. Estudos comparativos da variabilidade na composição de resina da folha entre árvore parenteral e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea* (Leguminosae, Caesalpinioideae, tribo Detarieae). II-Comparação de populações amazônicas adicionais com uma população do sudeste brasileiro. **Acta Amazônica**, v. 10, p. 293-309, 1980.
- SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; MIYAZAKI, S. SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; SASAKI, M.; ATTWOOD, D. Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mytomyacin C. **Int. J. Pharm.**, v. 172, p. 27-32, 1998.
- SULOVA, Z.; TAKÁCOVÁ, M.; STEELE, N.M.; FRY, S.C.; FARKAS, V. Xyloglucan endotransglycosylase: evidence for the existence of a relatively stable glycosyl-enzyme intermediate. **Biochem J.**, v. 330, p. 1475-1480, 1998.
- SULOVA, Z.; BARAN, R.; FARKAS, V. Release of complexed xyloglucan endotransglycosylase (XET) from plant cell walls by a transglycosylation reaction with xyloglucan-derived oligosaccharides. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 39, p. 927-932, 2001.
- SULOVA, Z.; BARAN, R.; FARKAS, V. Divergent modes of action on xyloglucan of two isoenzymes of xyloglucan *endo*-transglycosylase from *Tropaeolum majus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 41, p. 431-437, 2003.
- TAKAHASHI, A.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; LOEBENBERG, R.; BACHYNSKY, J.; ATTWOOD, D. Percutaneous absorption of non-

- steroidal anti-inflammatory drugs *in situ* gelling xyloglucan formulations in rats. **Inter. J. Pharm.**, v. 246, p. 179-186, 2002.
- TAKEDA, T.; MITSUISHI, Y.; SAKAI, F.; HAYASHI, T. Xyloglucan endotransglycosylation in suspension-cultured poplar cells. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 60, n. 12, p. 1950-1955, 1996.
- 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.**, v. 51, p. 158-173, 1973.
- THOMPSON, J.E.; SMITH, R.C.; FRY, S.C. Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall *in vivo*: evidence from $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ dual labelling and isopycnic centrifugation in cesium trifluoroacetate. **Biochem. J.**, v. 327, p. 699-708, 1997.
- THOMPSON, J.E.; FRY, S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. **Planta**, v. 211, p. 275-286, 2000.
- TINÉ, M.A.S.; CORTELAZZO, A.L.; BUCKERIDGE, M.S. Xyloglucan mobilization in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminisae-Caesalpinoideae). **Plant Science**, v. 154, p. 117-126, 2000.
- TINÉ, M.A.S. **O conteúdo informacional da molécula de xiloglucano de cotilédones de *Hymenaea courbaril* reflete suas funções em nível celular.** Campinas, 2002. 112 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas.
- TINÉ, M.A.S.; LIMA, D.U.; BUCKERIDGE, M.S. Galactose branching modulates the action of cellulase on seed storage xyloglucan. **Carbohydr. Polym.**, v. 52, p. 135-141, 2003.
- TOMINAGA, R.; SAMEJIMA, M.; SAKAI, F.; HAYASHI, T. Occurrence of cello-oligosaccharides in the apoplast of auxin-treated pea stems. **Plant Physiol.**, v. 119, p. 249-254, 1999.
- UMEMOTO, N.; KAKITANI, M.; IWAMATSU, A.; YOSHIKAWA, M.; YAMAOKA, N.; ISHIDA, I. The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 1029-1034, 1997.

- VARGAS-RECHIA, C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; HEYRAUD, A.; DRIGUEZ, H.; LIÉNART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 1013-1021, 1998.
- VARGAS-RECHIA, C.G. **Oligossacarídeos de xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: estrutura e atividade biológica.** 1998. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- VARNER, J.E.; LIN, L.-S. Plant cell architecture. **Cell**, v. 56, p. 231-239, 1989.
- VERMA, D.P.S.; MacLACHLAN, G.; BYRNE, H.; EWINGS, D. Regulation and in vitro translation of messenger ribonucleic acid for cellulase from auxin-treated pea epicotyls. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 1019-1026, 1975.
- VIERHIUS, E.; SCHOLS, H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Isolation and characterization of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv Koroneiki) at different ripening stages. **Carbohydr. Polym.**, v. 43, p. 11-21, 2000.
- VIERHIUS, E.; SCHOLS, H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Structural characterization of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv Koroneiki). **Carbohydr. Polym.**, v. 44, p. 51-62, 2001a.
- VIERHIUS, E.; YORK, W.S.; KUMAR KOLLI, V.S.; VINCKEN, J.-P.; SCHOLS, H.A.; vanHALEBEEK, G.-J.W.M.; VORAGEN, A.G.J. Structural analyses of two arabinose containig oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. **Carbohydr. Res.**, v. 332, p. 285-297, 2001b.
- VINCKEN, J.-P.; BELDMAN, G.; NIESSEN, W.M.A.; VORAGEN, A.G.J. Degradation of apple fruit xyloglucan by endoglucanase. **Carbohydr. Polym.**, v. 29, p. 75-85, 1996.
- VINCKEN, J.-P.; van den BROEK, L.A.M.; van der LEI, D.D.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Fungal and plant xyloglucanases may act in concert during liquefaction of apples. **J. Sci. Food Agric.**, v. 73, p. 407-416, 1997.
- VINCKEN, J.-P.; YORK, W.S.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 9-13, 1997.
- WAGNER, H.; STUPPNER, H.; SCHAFER, W.; ZENK, M. Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. **Phytochemistry**, London, v. 27, p. 119-126, 1988.

- WANG, Q.; ELLIS, P.R.; ROSS-MURPHY, S.B.; BURCHARD, W. Solution characteristics of the xyloglucan extracted from *Detarium senegalense* Gmelin. **Carbohydr. Polym.**, v. 33, p. 115-124, 1997.
- WATANABE, T.; TAKAHASHI, K.; MATSUDA, K. Isolation and characterization of oligosaccharides from purified cellulase digest of jojoba (*Simmondsia chinensis*) seed xyloglucan. **Agric. Biol. Chem.**, v. 44, n. 4, p. 791-797, 1980.
- WATT, D.K.; BRASCH, D.J.; LARSEN, D.S.; MELTON, L.D. Isolation, characterization, and NMR study of xyloglucan from enzymatically depectinized and non-depectinized apple pomace. **Carbohydr. Polym.**, v. 39, n.2, p. 165-180, 1999.
- WATT, D.K.; BRASCH, D.J.; LARSEN, D.S.; MELTON, L.D.; SIMPSON, J. Oligosaccharides related to xyloglucan: synthesis and X-ray crystal structure of methyl α -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-xylopyranoside and the synthesis of methyl α -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-xylopyranoside. **Carbohydr. Res.**, v. 325, p. 300-312, 2000.
- WATT, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 272, p. 1-40, 1993.
- WHISTLER, R.L.; FEATHER, M.S. Hemicellulose. Extraction from annual plants with alkaline solutions. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 144-145, 1965.
- WHITNEY, S.C.E.; GOTHARD, M.G.E.; MITCHELL, J.T.; GIDLEY, M.J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiol.**, v. 121, n. 2, p. 657-663, 1999.
- WISE, L.E.; MURPHY, M.; D'ADDIECO, A. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. **Paper Trade J.**, v. 122, n. 2, p. 35-46, 1946.
- WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-68, 1963a.
- WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.
- WYATT, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Anal. Chim. Acta.**, v. 272, p. 1-40, 1993.

- YAMAGAKI, T.; MITSUISHI, Y.; NAKANISHI, H. Structural analyses of xyloglucan heptasaccharide by the post-source decay fragment method using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 61, n. 8, p. 1411-1414, 1997.
- YAMAGAKI, T.; MITSUISHI, Y.; NAKANISHI, H. Structural analyses of xyloglucan oligosaccharides by the post-source decay fragmentation method of MALDI-TOF mass spectrometry: influence of degree of substitution by branched galactose, xylose and fucose on the fragment ion intensities. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 62, n. 12, p. 2470-2475, 1998.
- YORK, W.S.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan nonasaccharide. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 295-297, 1984.
- YORK, W.S.; OATES, J.E.; van HALBEEK, H.; ALBERSHEIM, P.; TILLER, P.R.; DELL, A. Location of *O*-acetyl substituents on a nonasaccharide repeating unit of sycamore extracellular xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, v. 173, p. 113-132, 1988.
- YORK, W.S.; van HALBEEK, H.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ¹H-NMR spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydr. Res.**, v. 200, p. 9-31, 1990.
- YORK, W.S.; HARVEY, L.K.; GUILLEN, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Structural analysis of tamarind xyloglucan oligosaccharides using β -galactosidase digestion and spectroscopic methods. **Carbohydr. Res.**, v. 248, p. 285-301, 1993.
- YORK, W. S.; IMPALLOMENI, G.; HISAMATSU, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Eleven newly characterized xyloglucan oligoglycosyl alditols: the specific effects of side chain structure and location on ¹H-NMR chemical shifts. **Carbohydr. Res.**, v. 267, p. 79-104, 1995.
- YORK, W.S.; KUMAR-KOLLI, V.S.; ORLANDO, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. **Carbohydr. Res.**, v. 285, p. 99-128, 1996.
- YORK, W. **The CCRC Database for Xyloglucan Oligosaccharide NMR Data**. Disponível em: <<http://128.192.9.30/cgi-bin/msql/xgnmr/query.msql>> Acesso em: 10 set. 2003.

- ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MÜLLER, B.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 1129-1138, 1995.
- ZABLACKIS, E.; YORK, W.S.; PAULY, M.; HANTUS, S.; REITER, W.-D.; CHAPPLE, C.C.S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis* mur 1. **Science**, v. 272, p. 1808-1810, 1996.
- ZHANG, G.F.; STAEHELIN, A. Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. **Plant Physiol.**, v. 99, p.1070-1083, 1992.
- ZOPF, D.A.; TSAI, C.-M.; GINSBURG, V. Carbohydrate antigens: coupling of oligosaccharide-phenylethylamine derivatives to edestin by diazotization and characterization of antibody specificity by radioimmunoassay. **Methods Enzymol.**, v. 50, p.163-16169, 1978.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

- 1999 BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Polysaccharides from the leaves of *Hymenaea courbaril* (L-70). XXVIII Reunião Anual SBBq. 22-25 maio. Caxambu-MG.
- 2000 BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Acidic xylan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. Third International Symposium on Natural Polymers and Composites. ISNaPol 2000. 14-17 maio. São Pedro-SP.
- 2000 BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, R. Hemicelluloses from the leaves of *Hymenaea courbaril*. XXVIII Reunião Anual SBBq. 27-30 maio. Caxambu-MG.
- 2001 BUSATO, A.P.; RECHIA, C.G.V.; REICHER, F. Enzymolysis of the fucosylated xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril* (P.33). Third Congress of Pharmaceutical Sciences. CIFARP 2001. 08-11 abril. Águas de Lindóia – SP.
- 2001 BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Enzymolysis of the fucosylated polysaccharide with a xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase (M-20). XXX Reunião Anual SBBq. 19-22 maio. Caxambu - MG.
- 2002 BOCHICCHIO, R.; SAIS, H.M.; LAZARINI, L.; BUSATO, A.P.; REICHER, F. Comparative analysis of cell wall xyloglucans from different plant groups (M-67). XXXI Reunião Anual SBBq. 18-21 maio. Caxambu - MG.
- 2002 BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. ESI-MS Spectrometry of the oligosaccharides derived from fucosylated xyloglucan of *Hymenaea courbaril* (M-68). XXXI Reunião Anual SBBq. 18-21 maio. Caxambu - MG.

2003 BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; GORIN, P.A.J.; BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. Fine structure of the xyloglucan from the leaves of *H. courbaril*. XXXII Reunião Anual SBBq. 17-20 maio. Caxambu - MG.

2003 BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; BOCHICCHIO, R.; TEIXEIRA, D.M.A.; BUCKERIDGE, M.S.; MOREIRA, R.A.; REICHER, F. Análise comparativa de xiloglucanas de diferentes fontes (12.123). XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. FESBE 2003. 27-30 agosto. Curitiba-PR.

ARTIGO PUBLICADO:

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

ARTIGO EM PREPARAÇÃO:

BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; GORIN, P.A.J.; PETKOWICZ, C.A.; TISCHER, C.A.; BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. 4-*O*-Substituted xylosyl units in the xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*.



Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*

Ana P. Busato^a, Carem G. Vargas-Rechia^b, Fany Reicher^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil

^bDepartamento de Química e Física, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Received 11 September 2000; received in revised form 5 February 2001

Abstract

A fucosylated xyloglucan was isolated from the leaves of *Hymenaea courbaril* by alkaline extraction, followed by ethanol precipitation and ion-exchange chromatography. The isolated polysaccharide showed Glc:Xyl:Gal:Fuc in molar ratio of 8.5:2.5:1 and $[\alpha]_D^{25} + 40.5^\circ$. Composition and linkage analyses, supported by NMR spectroscopic measurements, showed that the polysaccharide has a glucan backbone which is highly substituted at O-6 with D-xylopyranose residues, about a half of which are substituted at O-2 by D-galactopyranosyl units. Some of the galactose residues are further substituted by L-fucopyranose at O-2. The M_r , as determined by HPSEC, was 49,500. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Hymenaea courbaril*; Caesalpinaceae; Leaf polysaccharides; Cell wall; Hemicellulose; Fucosylated xyloglucan

1. Introduction

The primary cell wall is a dynamic and highly ordered complex network of several macromolecules, mainly polysaccharides, comprising pectic substances, hemicelluloses and fibrillar cellulosic material. Structural proteins and phenolic compounds are also present (Varner and Lin, 1989; McCann et al., 1995; Schindler, 1998). It plays an important role in controlling the growth rate of cells and morphogenetic processes, and acts as a barrier to plant pathogens (Keegstra et al., 1973).

Xyloglucan is a major hemicellulosic polysaccharide in Type I primary cell walls (Dicotyledoneae), which makes up about 20–25% (dry wt) (McNeil et al., 1984; Fry, 1989; Carpita and Gibeaut, 1993). It is also present as 2–5% of the Type II primary walls, the typical wall of Poaceae (Varner and Lin, 1989; Carpita, 1996). Xyloglucan was also found in gymnosperms (Kakegawa et al., 1998). Besides being a structural component of primary cell walls, xyloglucans play diverse important roles, namely the control of cell expansion, growth substance effects and as a reserve carbohydrate in seeds (Fry, 1989; Hayashi, 1989).

Xyloglucan is tightly bound to cellulose microfibrils by hydrogen bonds and forms a cellulose-xyloglucan network (Bauer et al., 1973; Hayashi et al., 1987; Carpita and Gibeaut, 1993). The dynamic nature of this cross-linking is proposed to be a major factor in controlling the rate of cell wall expansion, thereby regulating the plant cell wall (Bauer et al., 1973; Darvill et al., 1992). All xyloglucans, storage or structural, have a cellulosic backbone substituted at O-6 by α -D-xylopyranosyl units. Some xylosyl residues are further substituted at O-2 by β -D-galactopyranosyl units. In primary cells, some galactopyranosyl residues are substituted by fucopyranose (Fry, 1989; Carpita and Gibeaut, 1993).

Degradation and reconstruction of xyloglucan molecules, catalyzed by enzymes, such as endo-1,4- β -D-glucanases, xyloglucanases, α -L-fucosidase and xyloglucan endotransglycosylase are involved in the auxin- or acid-promoted breakdown of xyloglucans and regulate the ability to loosen the network in the cell wall and allow the cells to expand during growth (Hayashi et al., 1984; Nishitani and Tominaga, 1992; Fry et al., 1992). The nonasaccharide XXFG, an end-product of the digestion of xyloglucan by cellulase, has antiauxin activity in the pea stem segment straight-growth bioassay (York et al., 1984; McDougall and Fry, 1988). Substitution of the heptasaccharide XXXG core with one or two Gal residues to give XXLG and XLLG resulted in growth promotion

* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-1661; fax: +55-41-266-2042.

E-mail address: reicher@bio.ufpr.br (F. Reicher).

and *in vitro* stimulation of cellulase (McDougall and Fry, 1990). These oligosaccharides were also used to demonstrate their role as signal molecules in plant cells by ligand-binding experiments (Dunand et al., 2000).

Hymenaea courbaril, family Caesalpinaceae, is a species that occurs abundantly throughout Brazilian forests. The seeds contain 40–45% xyloglucan, as reserve carbohydrate, whose structure consists of a cellulosic-type (1→4)-linked β -D-glucan main chain and side chains containing α -D-xylopyranosyl and β -D-galactopyranosyl-(1→2)- α -D-xylopyranosyl residues, each (1→6)-linked to the main chain (Lima et al., 1993, 1995). The ability of endoglucanase I of *Humicola insolens* to cleave the (1→4)-linked β -D-glucosyl residues of xyloglucan from *H. courbaril* seeds was carried out and the released oligomers examined in terms of their biological activity (Vargas-Rechia et al., 1998). The auxin activity of the xyloglucan oligosaccharides in their reduced form was investigated. The octasaccharide (XXLGol), at nanomolar concentrations, promoted growth of wheat coleoptiles, independent of the presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). In addition, a system of *Rubus fruticosus* protoplasts or cells was used to study the signalling effect of induction of glycohydrolases and significant responses were found. The octasaccharide has the ability to induce, at nanomolar concentrations, a rapid increase in a α -L-fucosidase and to modulate 2,4-D or gibberellic acid-induced α -L-fucosidase (Vargas-Rechia et al., 1998).

This paper reports the isolation, composition and structural features of *H. courbaril* leaf xyloglucan and its relation with the xyloglucan from seeds of the same species.

2. Results and discussion

2.1. Polysaccharide isolation

Powdered leaves were defatted (~20%) with ethanol, then toluene-ethanol and extracted with 2% EDTA. The residual solid was delignified with sodium chlorite-acetic acid (Wise et al., 1946) and then extracted with water. EDTA, sodium chlorite-acetic acid and water extracts were treated with ethanol, yielding fractions which were denominated EI, EII and EIII, respectively. The hemicelluloses were recovered from the residual holocellulose by sequential extraction with 1 M KOH ($\times 3$) and 4 M KOH ($\times 3$). The alkaline extracts were treated with HOAc to pH 5. No precipitation was observed due to acidification in 1 M KOH extracts, and further precipitation with ethanol gave rise to hemicellulosic fractions, denominated IHT, IIHT and IIIHT. The extracts obtained with 4 M KOH, when treated with HOAc gave rise to hemicellulose A precipitates (IHA, IIHA and IIIHA). Hemicelluloses B were isolated from the supernatant of the 4 M KOH fractions, by precipitation with EtOH (IHB, IIHB

and IIIHB) (Whistler and Feather, 1965). Table 1 indicates the yield and composition of each fraction.

The protein content (Table 1) was determined using two methods and the results were significantly different. The differences are due to the interference of phenolic compounds, which react with the Folin-Ciocalteu reagent of the modified method of Lowry (Hartree, 1972). The Peterson (1977) method is also a modification of the Lowry method, but the protein is previous precipitated with sodium deoxycholate-trichloroacetic acid, so that the interfering substances remained in the supernatant. After solubilization of the protein precipitates using sodium dodecyl sulfate, the colorimetric reaction was also performed with the Folin-Ciocalteu reagent.

The fraction obtained in highest yield was IHT (14.1%, Table 1). However, its total sugar content was low and the protein content, obtained with the Hartree and Peterson methods, was 66.5 and 58.9%, respectively. The similarity of the values obtained by both methods confirms the high protein content. On the other hand, the interference of phenolic compounds was observed in EII, IHB, IIHB and IIIHB fractions.

Table 2 shows the monosaccharide composition of the fractions obtained. Fractions EI, EII and EIII are rich in uronic acid, galactose and arabinose, probably due to the presence of pectins. The sugar composition of fractions IHT, IIHT and IIIHT suggested that they contain a mixture of pectic and hemicellulosic polymers. Pectic polymers are predominant in IHT (41% uronic acid) and xylans in the other fractions (about 50% xylose).

The main monosaccharide component of hemicellulose A fractions (IHA, IIHA and IIIHA) is xylose (Table 2), indicating the occurrence of xylans. The chemical structure of the first fraction (IHA) was determined (Busato et al., 2000). It is an acidic xylan, $[\alpha]_D^{25} -78^\circ$ (0.5

Table 1
Composition of fractions obtained from the leaves of *Hymenaea courbaril*

Fraction	Extractant ^a	Yield ^b (%)	Total sugar ^c (%)	Protein ^d (%)	Protein ^e (%)
EI	2% EDTA	0.04	29.5	18.9	6.4
EII	2% NaClO ₂	3.3	14.5	21.3	5.3
EIII	H ₂ O	0.4	29.1	18.1	10.9
I HT	1 M KOH	14.1	14.6	66.5	58.9
II HT	1 M KOH	2.5	23.1	49.6	35.0
III HT	1 M KOH	2.3	22.9	36.3	23.2
I HA	4 M KOH	1.7	71.7	3.9	3.5
II HA	4 M KOH	0.3	65.3	6.8	6.5
III HA	4 M KOH	0.08	53.6	6.9	3.8
I HB	4 M KOH	2.2	44.8	17.9	7.7
II HB	4 M KOH	1.4	34.7	15.8	4.1
III HB	4 M KOH	0.4	37.6	9.5	1.8

^a At 25°C, except EII (70°C) and EIII (60°C).

^b Based on defatted leaves.

^c Dubois et al. (1956).

^d Hartree (1972).

^e Peterson (1977).

Table 2
Monosaccharide composition of fractions obtained from the leaves of *Hymenaea courbaril*

Fraction	Mol% ^a							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Uronic acids ^b
EI	5.4	0.4	16.3	1.8	0.5	20.6	10.9	44.1
EII	2.2	0.7	25.6	3.4	1.6	18.1	4.3	44.1
EIII	1.8	0.6	34.9	7.8	1.6	15.2	2.3	35.8
IHT	1.4	0.3	13.8	29.6	0.6	9.4	3.5	41.4
IIHT	1.6	0.5	15.0	49.1	0.6	9.5	4.4	19.3
IIIHT	1.4	0.3	13.6	50.7	1.7	8.9	2.3	21.1
IHA	0.7	–	0.6	90.4	0.2	0.6	0.4	7.1
IIHA	1.0	–	0.2	82.7	0.5	2.7	1.7	11.2
IIHA	1.3	1.7	10.6	50.9	4.1	12.5	10.7	8.2
IHB	1.0	3.6	11.2	33.8	1.6	13.5	22.9	12.4
IIHB	2.2	1.5	23.9	6.9	1.3	22.3	8.4	23.5
IIIBH	2.0	1.4	21.8	19.8	1.4	21.3	8.5	23.8
Final residue	2.8	0.8	10.4	32.3	6.7	8.0	39.0	n.d. ^c

^a Neutral sugar analyzed by GLC.

^b Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973), based on total sugar.

^c Not determined.

M NaOH; c 0.1), M_r 183,800, and is composed of a linear main chain of β -xylopyranosyl residues linked (1 $\rightarrow$ 4), substituted at O-2 with glucuronic acid and/or its 4-O-methyl derivative.

The final residue of alkaline extractions (28.6% yield; Table 2) contained 39.0% of glucose, probably from cellulose, and 32.3% of xylose, that indicates the presence of remaining xylans and xyloglucans.

Fraction IHB, extracted with 4 M KOH, was rich in xylose, glucose and contained fucose (Table 2), indicating the presence of xyloglucan, which could be present also as minor component in fractions IIHB and IIIBH. Most of the xyloglucan is strongly bound to cellulose and required 4 M KOH to be extracted. Once xyloglucan has been made soluble with alkali, it usually remains water-soluble even after neutralization, so that xyloglucan is a hemicellulose-B (Fry, 1989). Fraction IHB contained uronic acids (~12.4%) and was subjected to anion-exchange chromatography, in order to eliminate the acidic polymers (Table 3).

The column was eluted with water followed by saline solutions. The water-eluted fraction (52% yield; XG-1), showed Glc:Xyl:Gal:Fuc in a molar ratio of 7:5:3:1, respectively and a low amount of acidic residues (~4.1%). It was re-chromatographed on the same column. The purification steps increased the total sugar content in the purified sample, as observed in Table 3. Most protein and phenolic components were eliminated from original sample (IHB, Table 1). The protein content in the purified xyloglucan (78% yield, XG-2) was 2.3%. This fraction showed Glc:Xyl:Gal:Fuc in a molar ratio of 8:5:2.5:1. The molar proportions are consistent with the ratio obtained for xyloglucans from other plant sources (Siddiqui and Wood, 1977; O'Neill and Selvendran, 1983; Buchala et al., 1993; Vincken et al., 1994; Cutillas-Iturralde et al., 1998).

Table 3
Fractionation of hemicellulose B (IHB) by DEAE-trisacryl

Fraction	Mol% ^a								
	Total sugar (%)	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Uronic acids ^b
IHB ^c	44.8	1.0	3.6	11.2	33.8	1.6	13.5	22.9	12.4
XG-1 ^d	78.5	0.8	5.5	6.4	25.3	3.3	18.4	36.2	4.1
XG-2 ^e	83.3	–	5.6	1.2	29.2	3.1	13.9	46.8	–

^a Neutral sugar analyzed by GLC.

^b Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973), based on total sugar.

^c Original fraction.

^d Obtained by elution of IHB with water.

^e Obtained by rechromatography of XG-1 under the same conditions.

dran, 1983; Buchala et al., 1993; Vincken et al., 1994; Cutillas-Iturralde et al., 1998).

The purified fraction also contained mannosyl residues (3.1%, Table 3). The presence of mannose during xyloglucan purification has been previously described (O'Neill and Selvendran, 1983; Redgwell and Selvendran, 1986; Vincken et al., 1994, 1996; Cutillas-Iturralde et al., 1998) and was said to be an impurity (Fry, 1989).

2.2. Fucosylated xyloglucan analysis

The purified xyloglucan was soluble in water. The polysaccharide showed a specific rotation of $[\alpha]_D^{25} + 40.5^\circ$ (H₂O; c 0.5) that it is in close agreement with reported values for other fucosylated xyloglucans (Siddiqui and Wood, 1977; Watanabe et al., 1980).

Fraction XG-2 was analyzed by high performance size exclusion chromatography (HPSEC) with multi-detection for molecular weight determination. HPSEC, using a light scattering detector, was considered by Rinaudo (1993) as the only valid method to characterize polysaccharides over a wide range of molecular weights. The molecular weight (M_r) of XG-2 fraction is 49,500 by this method. The elution profile of xyloglucan indicates its homogeneity (Fig. 1).

The purified xyloglucan was subjected to methylation analysis (Ciucanu and Kerek, 1984), and the results are shown in Table 4. The overall recoveries of methylated alditol acetates (Glc: Xyl: Gal: Fuc ratio 8: 4: 2: 1) were in good agreement with the ratio found for the original polysaccharide after hydrolysis, reduction and acetylation. The methylation analysis data show that the polysaccharide has a highly branched structure. The results suggest that the xyloglucan contains a (1 $\rightarrow$ 4)-glucan backbone, ~60% of the units of which were substituted at O-6. Terminal fucose, galactose and xylose both substituted at O-2 are present, suggesting the presence of Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)-Galp(1 $\rightarrow$ 2)-Xylp-(1 $\rightarrow$ as a side chain, and all sugars are in the pyranose form. The peak whose retention time is 737 s (Table 4) could be also, under the

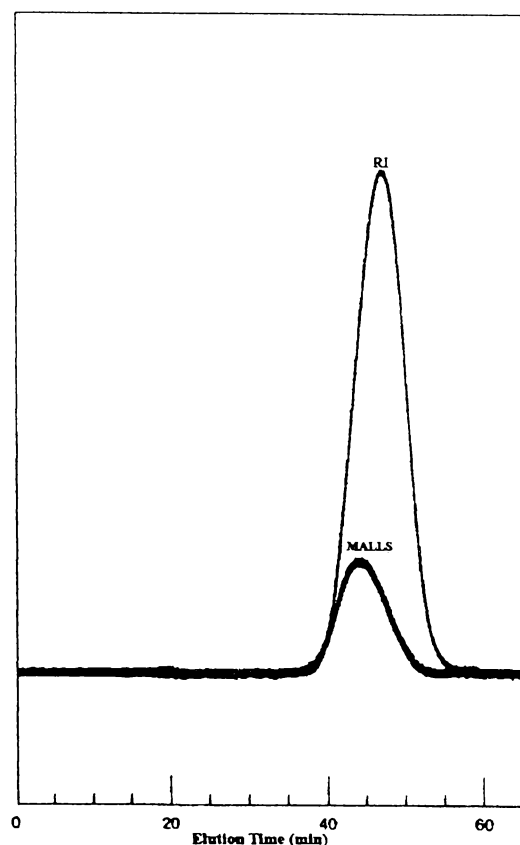


Fig. 1. High performance size exclusion chromatography (HPSEC) of the fraction XG-2, with light scattering (MALLS) and refractive index (RI) detection.

experimental conditions used, 2,3-Me₂Xyl, indicating 4-*O*-substituted xylopyranosyl or 5-*O*-substituted xylofuranosyl residues. However, this is not likely.

These data are consistent with those found for xyloglucans from other plant sources (Siddiqui and Wood, 1977; O'Neil and Selvendran, 1983, 1985; Stevens and Selvendran, 1984; Redgwell and Selvendran, 1986;

Table 4

Methylation analysis of xyloglucan (XG-2) from the leaves of *Hymenaea courbaril*

<i>O</i> -Methylated alditol acetate ^a	Linkage indicated	Mol%	RT ^a
2,3,4-Me ₃ Xyl	(Xylp)1→	12.9	545
2,3,4-Me ₃ Fuc	(Fucp)1→	6.5	552
2,3,4,6-Me ₄ Glc	(Glc p)1→	1.2	704
2,3,4,6-Me ₄ Gal	(Galp)1→	3.9	711
3,4-Me ₂ Xyl	→2(Xylp)1→	14.1	737
3,4,6-Me ₃ Gal	→2(Galp)1→	7.3	864
2,3,6-Me ₃ Gal	→4(Galp)1→	3.5	875
2,3,6-Me ₃ Glc	→4(Glc p)1→	17.2	888
2,3,4-Me ₃ Glc	→6(Glc p)1→	1.6	1009
2,3-Me ₂ Glc	→4(Glc p)1→	31.8	1316
	6 ↑		

^a Retention time in s.

Mabusela et al., 1990; Renard et al., 1992; Buchala et al., 1993; Vincken et al., 1994; Cutillas-Iturralde et al., 1998). In addition small amounts of 2,3,6-Me₃Gal and traces of 2,3,4-Me₃Glc were detected.

Fig. 2 shows the ¹³C NMR spectra of XG-2 fraction. In Table 5, the anomeric carbon chemical shifts of XG-2 are compared with those of xyloglucan obtained from the seeds of *H. courbaril* (Buchala et al., 1993; Lima et al., 1993). The well-defined anomeric signals at about 104.4, 102.4, 99.4, 98.9 ppm are attributed to terminal β-galactopyranosyl, β-glucopyranosyl and terminal and internal α-xylopyranosyl residues respectively. The anomeric carbon chemical shifts of XG-2 are compared with those of xyloglucan from the seeds (Lima et al., 1993) and they are closely related (Table 5). The other signals present in the anomeric region of ¹³C NMR spectrum of the leaf xyloglucan, were not found in that of seeds. These are attributed to internal β-galactose and α-fucose, confirming the presence of Fucp-(1→2)-Galp(1→2)-Xylp-(1→ as a side chain. It was also possible to distinguish signals from the C-4 and C-6 substituted β-glucopyranosyl residues at about 79.9 and 66.3 ppm respectively, and the latter is inverted in ¹³C DEPT spectrum. The other signals that are inverted in ¹³C DEPT spectra, between 61.6 and 60.2 ppm can be assigned to C-6 of β-galactopyranosyl, C-5 of α-xylopyranosyl and C-6 of β-glucopyranosyl units. The signal at high field (15.8 ppm) arises from C-6 of fucopyranosyl residues.

The structure of the xyloglucan from the leaves of *H. courbaril* is broadly typical of those xyloglucans detected in primary cell walls of other plants. It has a cellulosic backbone which is highly substituted at *O*-6 with D-xylopyranosyl residues, about a half of which are substituted by D-galactopyranosyl residues at *O*-2. Some of the galactosyl residues are further substituted at *O*-2 by L-fucose. The two most abundant subunits of type I cell wall xyloglucans are the nonasaccharide, XXFG, and the heptasaccharide, XXXG (Bauer et al., 1973; Hayashi et al., 1984; Guillén et al., 1995). However, the presence of a well-defined anomeric signal of terminal β-galactopyranose at ~104.4 ppm (Fig. 2, Table 5) could indicate that the xyloglucan from the

Table 5

Comparison of C-1 chemical shifts (δ) of ¹³C NMR spectra for XG-2 fraction and xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril*^a

C-1	δ (ppm)	
	Fraction XG-2	Seeds xyloglucan
Terminal β-D-galactose	104.4	104.5
Internal β-D-galactose	103.2	—
β-D-Glucose	102.4	102.5
α-L-Fucose	101.6	—
Terminal α-D-xylose	99.4	99.1
Internal α-D-xylose	98.9	98.7

^a Lima et al. (1993).

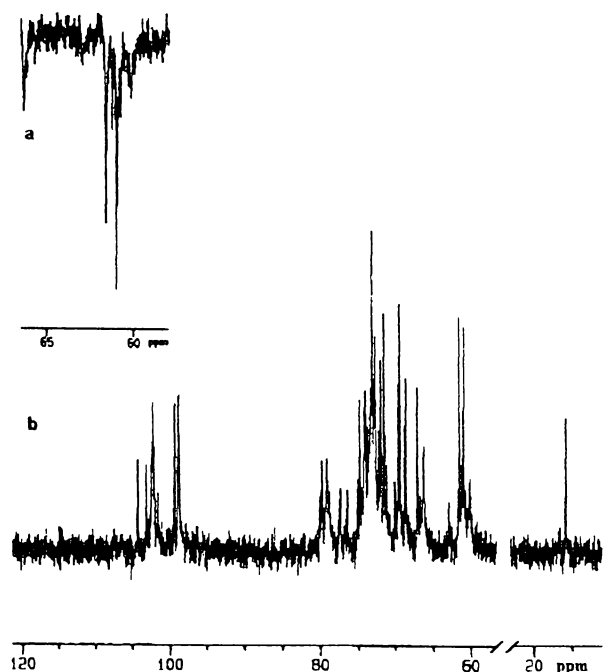


Fig. 2. (a) ^{13}C DEPT and (b) ^{13}C NMR spectrum of fraction XG-2 in D_2O , 50°C .

leaves of *H. courbaril* is also composed of some decasaccharide XLFG and/or nonasaccharide XLLG, in addition to XXFG and XXXG. These will be confirmed by future characterization of the oligosaccharides.

Comparative analysis of xyloglucans from seeds and leaf of *H. courbaril* gives rise results which are compatible with their functions, such as the differences observed in the M_r 300,000 for the polysaccharide from the seeds (Lima et al., 1993) and 49,500 for that obtained from the leaves. Another difference was observed in the $[\alpha]_D^{25}$ value, that was $+79.3^\circ$ for the seeds xyloglucan (Lima et al., 1993) and $+40.5^\circ$ for the leaf xyloglucan. The lower value obtained for the latter is probably due to the presence of α -L-fucosyl residues.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Specific rotation was obtained, from a 0.5% solution, in water at 25°C , using an Autopol III automatic polarimeter.

Uronic acid was estimated according Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973), using galacturonic or glucuronic acids as standards. Total carbohydrate was determined by the $\text{PhOH-H}_2\text{SO}_4$ method (Dubois et al., 1956), using glucose as standard, and protein content by the Hartree (1972) and Peterson (1977) methods, using BSA as standard.

Polysaccharide fractions were hydrolyzed with M TFA (5 h, at 100°C), except final residue with 72% H_2SO_4 (1 h, at 0°C) and then diluted to 8% (5 h, at 100°C) (Saeman et al., 1954). After removal of acid, monosaccharides were reduced with NaBH_4 and acetylated with Ac_2O –pyridine (1:1 v/v, 16 h, at 25°C). The resulting alditol acetates were analyzed by GLC, using a 5890 A II HP gas chromatograph at 220°C (FID and injector temperature, 250°C) with DB-210 capillary column (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m), film thickness 0.25 μm , the carrier gas being N_2 (2.0 ml/min).

The xyloglucan was methylated according to Ciucanu and Kerek (1984). The procedure was repeated until the products did not show OH absorption in the IR at 3400 cm^{-1} . The methylated polysaccharide was refluxed with 3% MeOH-HCl for 2 h and then hydrolyzed with 0.5 M H_2SO_4 (14 h, at 100°C). The resulting mixtures of *O*-methylated aldoses were reduced with NaBH_4 and then acetylated. The partially *O*-methylated alditol acetates were analyzed by capillary GC–MS, using a 3300 Varian gas chromatograph linked to an 810 R-12 Finnigan ion-trap mass spectrometer, using He as the carrier gas (2.0 ml/min). A capillary column of DB-210 (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m) was used. The former was held at 50°C during injection and then programmed at $40^\circ\text{C}/\text{min}$ to 220°C (constant temperature).

The ^{13}C NMR and ^{13}C DEPT spectra were obtained with a DRX-400 Bruker spectrometer at 100 MHz in the Fourier transform mode, with complete proton decoupling at 50°C , using D_2O as solvent, contained in a tube of 0.5 cm i.d. Chemical shifts are reported as δ (ppm) relative to the resonance of DDS (sodium 4,4-dimethyl-4-silopentano-1-sulphonate), used as a internal standard ($\delta = 0$). The spectral width was 200 ppm.

High pressure size exclusion chromatography (HPSEC) was carried out on 5 mg/ml XG-2 fraction solutions, using a multidetection equipment in with a Waters 2410 differential refractometer (RI) and a Wyatt Technology Dawn F multi-angle laser light scattering (MALLS) detector were adapted on-line. Four Waters Ultrahydrogel 2000/500/250/120 columns were connected in series and coupled to the multidetection equipment. A 0.1 M NaNO_3 solution, containing NaN_3 (0.5 g/l), was used as eluent. The refractive index increment was determined by using a refractive index detector. The value of dn/dc (differential refractive index increment of the solvent-solute solution with respect to a change in solute concentration) was 0.172 at 633 nm.

3.2. Plant material

Hymenaea courbaril leaves were collected in August 1997, from the campus of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, where a voucher specimen is deposited in the Herbarium (SPFR), under the number 05312.

3.3. Polysaccharide extraction

Dry leaves (100 g) were triturated and extracted successively with absolute EtOH (170 h) and C₆H₅–CH₃:EtOH (2:1, 48 h) in a Soxhlet. The remaining solid material (80 g) was extracted with 2% EDTA (3 h, at 25°C), delignified with 2% aq. NaClO₂ and HOAc (6 h, at 70°C, pH 4) (Wise et al., 1946) and was submitted to aq. extraction at 60°C (6 h). The extracts were neutralized with 50% (v/v) HOAc, completely dialyzed against H₂O when necessary, conc., and pptd. with EtOH. The extracts were solubilized with H₂O and freeze-dried. The resulting holocellulose was then successively treated with 1 M KOH and 10 mM NaBH₄ (8 h, at 25°C, under a N₂ atmosphere, ×3). The alkaline extracts were adjusted with 50% (v/v) HOAc to pH 5, and then pptd. with EtOH, yielding IHT, IIHT and IIIHT fractions. The residue of 1M KOH extraction were treated with 4 M KOH and 10 mM NaBH₄ (8 h, at 25°C, under a N₂ atmosphere, ×3). The 4 M KOH extracts were acidified to pH 5 with 50% (v/v) HOAc, giving rise to hemicellulose A precipitation (IHA, IIHA and IIIHA fractions). Supernatants were dialysed against running water and treated with ethanol, giving rise to precipitation of hemicellulose B fractions, namely IHB, IIHB and IIIHB (Whistler and Feather, 1965).

3.4. Xyloglucan isolation

Ion-exchange chromatography of the IHB fraction was carried out on a DEAE-Trisacryl (chloride form) column (23 × 0.8 cm) and eluted successively with H₂O, 0.5, 1 and 2 M NaCl, and 0.5 M NaOH. The collected fractions were analyzed for total sugar (Dubois, et al., 1956). After dialysis, polysaccharide fractions were recovered by pptn. with EtOH, solubilized with H₂O and then freeze-dried. The fraction eluted with H₂O (XG-1) was further purified by fractionation on the same column.

Acknowledgements

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil), Pronex-Carboidratos and the Universidade Federal do Paraná.

References

Bauer, W.D., Talmadge, K.W., Keegstra, K., Albersheim, P., 1973. The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 51, 174–187.
 Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484–489.
 Buchala, A.J., Genoud, T., Roulin, S., Summermatter, K., 1993. Xyloglucans in different types of cotton (*Gossypium* sp.) cells. *Acta Bot. Neerl.* 42, 213–219.

Busato, A.P., Vargas-Rechia, C.G., Reicher, F., 2000. Acidic xylan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. In: Mattoso, L.H.C., Leão, A., Frollini, E. (Eds.), *Natural Polymers and Composites*. Embrapa, São Carlos-SP, Brazil, pp. 157–161.
 Carpita, N.C., 1996. Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 445–476.
 Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30.
 Ciucanu, I., Kerek, V., 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 131, 209–217.
 Cutillas-Iturralde, A., Peña, M.J., Zarra, I., Lorences, E.P., 1998. A xyloglucan from persimmon fruit cell walls. *Phytochemistry* 48, 607–610.
 Darvill, A.G., Augur, C., Bergmann, C., Carlson, R.W., Cheong, J.-J., Eberhard, S., Hahn, M.G., Ló, V.-M., Marfà, V., Meyer, B., Mohnen, D., O'Neil, M.A., Spiro, M.D., VanHalbeek, H., York, W.S., Albersheim, P., 1992. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology* 2, 181–198.
 Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
 Dunand, C., Gautier, C., Chambat, G., Liénart, Y., 2000. Characterization of the binding of α-L-Fuc(1→2)-β-D-Gal(1→), a xyloglucan signal, in blackberry protoplasts. *Plant Sci.* 151, 183–192.
 Fry, S.C., 1989. The structure and functions of xyloglucan. *J. Exp. Bot.* 40, 1–11.
 Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K., Matthews, K.J., 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282, 821–828.
 Guillén, R., York, W.S., Pauly, M., An, J., Impallomeni, G., Albersheim, P., Darvill, A.G., 1995. Metabolism of xyloglucan generates xylose-deficient oligosaccharide subunits of this polysaccharide in etiolated peas. *Carbohydr. Res.* 277, 291–311.
 Hartree, E.F., 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48, 422–427.
 Hayashi, T., 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.* 40, 139–168.
 Hayashi, T., Marsden, M.P.F., Delmer, D.P., 1987. Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiol.* 83, 384–389.
 Hayashi, T., Wong, Y.-S., MacLachlan, G., 1984. Pea xyloglucan and cellulose. II. Hydrolysis by pea endo-1,4-β-glucanases. *Plant Physiol.* 75, 605–610.
 Kakegawa, K., Edashige, Y., Ishi, T., 1998. Xyloglucan from xylem-differentiating zones of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 47, 767–771.
 Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D., Albersheim, P., 1973. Structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.* 51, 188–197.
 Lima, N.N., Reicher, F., Corrêa, J.B.C., Ganter, J.L.M.S., Sierakowski, M.-R., 1993. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá). *Cien. Cult.* 45, 22–26.
 Lima, N.N., Reicher, F., Corrêa, J.B.C., Ganter, J.L.M.S., Sierakowski, M.-R., 1995. Oligosaccharides derived from the xyloglucan from the seeds of *Hymenaea coubaril* var. *stilbocarpa*. *Int. J. Biol. Macromol.* 17, 413–415.
 Mabusela, W.T., Stephen, A.M., Botha, M.C., 1990. Carbohydrate polymers from *Aloe ferox* leaves. *Phytochemistry* 29, 3555–3558.
 McCann, M.C., Roberts, K., Wilson, R.H., Gidley, M.J., Gibeaut, D.M., Kim, J.-B., Carpita, N.C., 1995. Old and new ways to probe plant cell-wall architecture. *Can. J. Bot.* 73, 103–113.

- McDougall, G.J., Fry, S.C., 1988. Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific nonasaccharide of xyloglucan. *Planta* 175, 412–416.
- McDougall, G.J., Fry, S.C., 1990. Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. *Plant Physiol.* 93, 1042–1048.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 625–663.
- Nishitani, K., Tominaga, R.J., 1992. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyses transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* 267, 21058–21064.
- O'Neill, M.A., Selvendran, R.R., 1983. Isolation and partial characterization of a xyloglucan from the cell walls of *Phaseolus coccineus*. *Carbohydr. Res.* 111, 239–255.
- O'Neill, M.A., Selvendran, R.R., 1985. Structural analysis of the xyloglucan from *Phaseolus coccineus* cell-walls using cellulase-derived oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 145, 45–58.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Redgwell, R.J., Selvendran, R.R., 1986. Structural features of cell-wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carbohydr. Res.* 157, 183–199.
- Renard, C.M.G.C., Lomax, J.A., Boon, J.J., 1992. Apple fruit xyloglucans: a comparative study of enzyme digests of whole cell walls and alkali-extracted xyloglucans. *Carbohydr. Res.* 232, 303–320.
- Rinaudo, M., 1993. Polysaccharide characterization in relation with some original properties. *J. Appl. Poly. Sci.: Appl. Polym. Sympos.* 52, 11–17.
- Saeman, J.F., Moore, W.E., Mitchell, R.L., Millet, M.A., 1954. Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tech. Assoc. Pulp. Pap. Ind.* 37, 336–343.
- Schindler, T.M.Z., 1998. The new view of primary cell wall. *Pflanzen-ernähr. Boden.* 161, 499–508.
- Siddiqui, I.R., Wood, P.J., 1977. Structural investigation of sodium hydroxide-soluble rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 53, 85–94.
- Stevens, B.J.H., Selvendran, R.R., 1984. Hemicellulosic polymers of cabbage leaves. *Phytochemistry* 23, 339–347.
- Vargas-Rechia, C., Reicher, F., Sierakowski, M.R., Heyraud, A., Driguez, H., Liénart, Y., 1998. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. *Plant Physiol.* 116, 1013–1021.
- Varner, J.E., Lin, L.-S., 1989. Plant cell architecture. *Cell* 56, 231–239.
- Vincken, J.P., Beldman, G., Voragen, A.G.J., 1994. The effect of xyloglucans on the degradation of cell-wall-embedded cellulose by the combined action of cellobiohydrolase and endoglucanases from *Trichoderma viride*. *Plant Physiol.* 104, 99–107.
- Vincken, J.P., Wijsman, A.J.M., Beldman, G., Niessen, W.M.A., Voragen, A.G.J., 1996. Potato xyloglucan is built from XXGG-type subunits. *Carbohydr. Res.* 288, 219–232.
- York, W.S., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1984. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan nonasaccharide. *Plant Physiol.* 75, 295–297.
- Watanabe, T., Takahashi, K., Matsuda, K., 1980. Isolation and characterization of oligosaccharides from purified cellulase digest of jojoba (*Simmondsia chinensis*) seed xyloglucan. *Agric. Biol. Chem.* 44, 791–797.
- Whistler, R.L., Feather, M.S., 1965. Extraction from annual plants with alkaline solutions. *Methods Carbohydr. Chem.* 5, 144–145.
- Wise, L.E., Murphy, M., D'Addieco, A., 1946. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade J.* 122, 35–46.