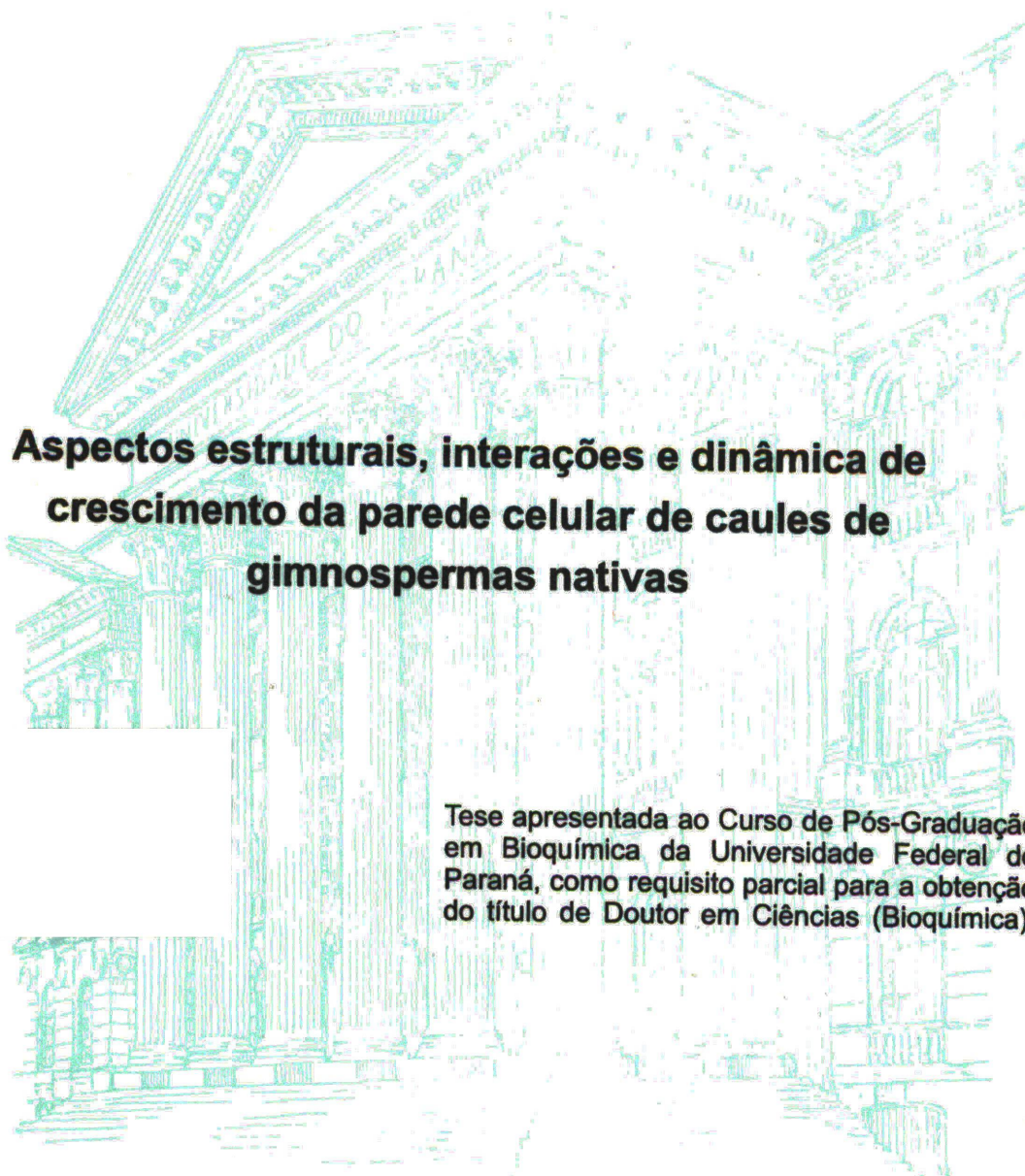


RENATO BOCHICCHIO



**Aspectos estruturais, interações e dinâmica de crescimento da parede celular de caules de gimnospermas nativas**

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

CURITIBA

2003

RENATO BOCHICCHIO

**Aspectos estruturais, interações e dinâmica de  
crescimento da parede celular de caules de  
gimnospermas nativas**

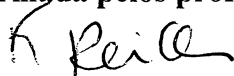
Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Bioquímica da Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

CURITIBA  
2003

**RENATO BOCHICCHIO**

**ASPECTOS ESTRUTURAIS, INTERAÇÕES E DINÂMICA DE  
CRESCIMENTO DA PAREDE CELULAR DOS  
CAULES DE GIMNOSPERMAS**

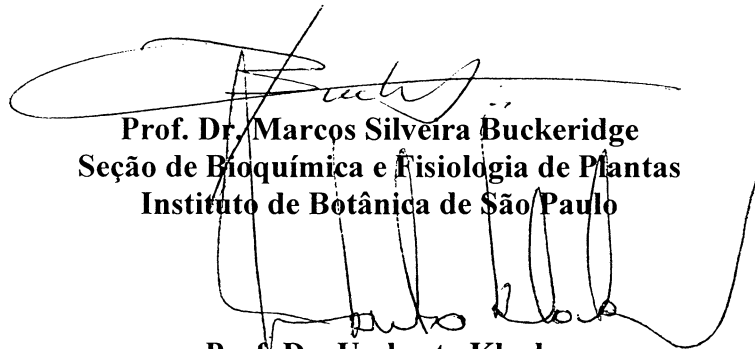
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica) no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:



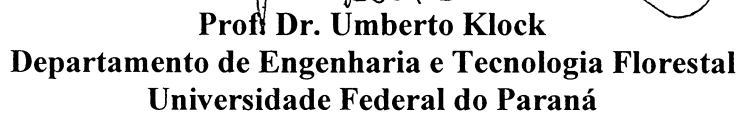
**Profª Drª Fany Reicher (Orientadora)**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**Universidade Federal do Paraná**



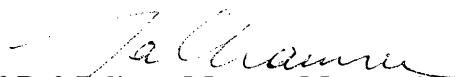
**Profª Drª Carem Gledes Vargas Rechia**  
**Departamento de Farmácia**  
**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**  
**Universidade de São Paulo**



**Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge**  
**Seção de Bioquímica e Fisiologia de Plantas**  
**Instituto de Botânica de São Paulo**



**Prof. Dr. Umberto Klock**  
**Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal**  
**Universidade Federal do Paraná**



**Profª Drª Juliana Maurer Menestrina**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**Universidade Federal do Paraná**

Curitiba, 23 de julho de 2003

Orientação: Profa. Dra. Fany Reicher

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, eternamente grato pelo que sou hoje e por todas as condições que me oferecem para ser alguém amanhã...

À Mariana, meu equilíbrio, meu amor!

Aos meus irmãos Carlos e Eduardo. Mesmo de longe, sei que no fundo acreditaram em mim...

À minha orientadora, Profa.Dra. Fany Reicher, pela orientação, pelo excepcional dinamismo e espírito de liderança. Virtudes que me valeram como aprendizado durante meu período no laboratório e que certamente servirão como exemplo em meu futuro profissional.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, representado pelas Profas. Dras. Fany Reicher, Maria Benigna Martinelli de Oliveira e Leda Chubatsu durante meu período de permanência no Departamento. Agradeço especialmente pelo bom senso de suas decisões em situações, sempre atendendo as necessidades e interesses do Departamento e dos alunos que compõe o Curso.

À Chefia do Departamento, representado pelo Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa.

Às minhas colegas e amigas de laboratório Ana Paula, Andréia, Carmen e Heloísa, com quem compartilhei meus momentos de alegrias, juntamente com outros momentos não tão felizes... guardo de vocês as melhores recordações!

A quem já passou pelo Laboratório, meu sincero agradecimento. Aprendi muito com todos, principalmente que convivência é uma arte!

Ao Prof. Dr. Philip Gorin, a quem reservo meu respeito pelo pesquisador que é, sua experiência, conselhos científicos e pela excelente companhia em tantas reuniões informais com os alunos.

À Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter, mesmo longe do Brasil, sempre lembrarei como alguém que me deixou ótimos conselhos científicos e de vida.

A todos os professores do Departamento, pelo eterno esforço em manter a produção científica do Departamento.

À banca examinadora interna, composta pelas Profas. Dras. Juliana Menestrina e Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz, pelas sugestões pertinentes ao enriquecimento da tese.

Aos meus amigos Guilherme e César. Quase uma década de amizade. E o fato de ficarmos cada vez mais velhos é somente proporcional a nossa capacidade de beber outra cerveja para esquecer disso...

À minha prima Rose Adele, a quem suporto com amor e carinho.

Ao Rodrigo Vassoler, extraordinário companheiro de viagem e amigo de todas as horas.

Ao Rodrigo Reis, primeiro por considerar meu amigo do peito. Agradeço também pelo esforço e colaboração nos experimentos de cultivo de células.

A todos os amigos e colegas hoje presentes no Departamento, bem como aqueles que já passaram por ele. Todos foram muito importantes para mim.

Aos meus sogros Clícia e Fausto, pelo carinho que demonstram por mim e pelo efeito terapêutico que cada visita a vocês me proporciona...

Ao Prof. Marcos Silveira Buckeridge, da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo, pelas análises de oligossacarídeos de xiloglucana.

Ao Prof. Iedo Alquini, do Departamento de Botânica da UFPR, pelo valioso auxílio na confecção das lâminas de *Araucaria angustifolia* e a interpretação dos resultados.

Ao Prof. Miguel Pedro Guerra, do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo fornecimento de células cultivadas de *Araucaria angustifolia*.

À técnica de laboratório Neusa Steiner, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela confecção dos experimentos de células cultivadas de *Araucaria angustifolia*.

Às funcionárias da biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela demonstração de presteza e eficiência.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
FLUXOGRAMAS .....	xv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xvi
RESUMO .....	xx
ABSTRACT .....	xxi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Parede primária .....	1
a) Xiloglucanas .....	4
b) Xilanas .....	6
c) Glucanas .....	7
d) Pectinas .....	8
e) Proteínas estruturais .....	13
1.2. Parede secundária .....	15
a) O-Acetil-galactoglucomanana (GGM) .....	17
b) Arabino-4-O-metilglucuronoxilana (AGX) .....	18
1.3. Gimnospermas nativas .....	21
a) <i>Araucaria angustifolia</i> .....	21
b) <i>Podocarpus sp.</i> .....	23
1.4. Justificativas .....	25

2. OBJETIVOS .....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
3.1. Obtenção do material de parede primária .....	27
a) Plantio convencional .....	27
b) Cultivo de células .....	27
3.2. Obtenção do material de parede secundária .....	28
3.3. Obtenção de polissacarídeos da parede primária .....	30
3.4. Obtenção de polissacarídeos da parede secundária .....	32
3.5. Monitoramento de formação da parede celular em plântulas de <i>A. angustifolia</i> ...	34
a. Microscopia óptica .....	34
b. Composição monossacarídica .....	35
3.6. Análises colorimétricas .....	36
3.7. Determinação da composição monossacarídica .....	37
3.8. Análise de homogeneidade e determinação de massa molecular .....	38
3.9. Purificação das frações polissacarídicas .....	39
3.10. Análises de metilação .....	40
a) Método de Haworth .....	40
b) Método de Ciucanu .....	40
3.11. Carboxi-redução .....	42
3.12. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	42
3.13. Obtenção de oligossacarídeos de xiloglucanas por hidrólise enzimática .....	43
3.14. Fragmentação de massa por Electrospray-MS (ESI-MS) .....	44



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4.1. Polissacarídeos das plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	45
4.1.1. Monitoramento dos teores de parede primária e secundária .....	47
4.1.2. Extração de polissacarídeos .....	53
4.1.3. Purificação e elucidação das principais estruturas .....	59
a) Análise da fração MPP1-I .....	59
b) Análise das frações MPP4-I a MPP10-I .....	65
4.2. Polissacarídeos do xilema .....	75
4.2.1. Obtenção e caracterização geral do material de pesquisa .....	74
4.2.2. Análise das frações extraídas com KOH .....	76
4.2.3. Análise de arabinoxilanas de <i>Podocarpus lambertii</i> e <i>Podocarpus selowii</i> ..	84
4.2.3. Análise das frações extraídas com NaOH .....	86
4.3. Dinâmica de crescimento .....	90
4.4. Análise da composição monossacarídica da parede celular de células de <i>Araucaria angustifolia</i> crescidas em suspensão .....	112
4.5. Considerações finais .....	115
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	121

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Estrutura química parcial de uma xiloglucana de parede primária .....	5
<b>Figura 2.</b> Estrutura química parcial de uma glucuronoarabinoxilana .....	7
<b>Figura 3.</b> Estrutura química parcial de uma $\beta$ -glucana .....	8
<b>Figura 4.</b> Estrutura química parcial de a) homogalacturonana metil-esterificada; b) formação de uma rede de pectinas envolvendo ligações iônicas de regiões não-esterificadas ( $\text{COO}^-$ ) por ions cálcio; c) ramnogalacturonana tipo I (RG-I).	9
<b>Figura 5.</b> Estrutura química parcial de uma arabinogalactana tipo I .....	10
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do ácido acérico (a) e apiose (b) .....	11
<b>Figura 7.</b> Estrutura química parcial de uma ramnogalacturonana tipo II .....	12
<b>Figura 8.</b> Estruturas propostas de porções da extensina de paredes primárias de diversas espécies .....	13
<b>Figura 9.</b> Fotografias da parede celular de coníferas evidenciando a) o aspecto geral da madeira de <i>Pinus nigra</i> ; b) anatomia dos traqueóides axiais e c) diferenciação das paredes primária e secundária .....	15
<b>Figura 10.</b> Estrutura química parcial de uma O-acetil-galactoglucomanana de gimnosperma .....	17
<b>Figura 11.</b> Estrutura química parcial de uma arabino-4-O-metil glucuronoxilana de gimnosperma .....	19
<b>Figura 12.</b> Fotografia de a) <i>Araucaria angustifolia</i> e b) <i>Podocarpus lambertii</i> .....	22

<b>Figura 13.</b> Esquema das vantagens e desvantagens do emprego do plantio convencional e cultivo de células para obtenção de parede celular primária.	47
<b>Figura 14.</b> Corte transversal da porção superior do caule. <b>a)</b> Cromátides em organização; aumento 40X. <b>b)</b> Cromátides em fase mitótica final; células em diferenciação (1); aumento 40X. <b>c)</b> Aspectos gerais da porção superior do caule, apresentando todos os núcleos preservados; aumento 10X .....	50
<b>Figura 15.</b> <b>a)</b> Corte transversal da porção média do caule (40X), mostrando seus aspectos gerais, presença de células compartimentadas (1), algumas células com núcleo preservado (2); células maiores sem núcleo (3) e canais resiníferos (4). <b>b)</b> porção média do caule mostrando as células compartimentadas, em detalhe (1) <b>c).</b> Detalhe da porção inferior (100X), mostrando células com alto conteúdo celulósico (1); pontoação areolada (2)	51
<b>Figura 16.</b> Modelo ilustrativo das porções superior (S), média (M) e inferior (I) das amostras de caules das plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	52
<b>Figura 17.</b> Perfil de eluição (HPSEC) da fração obtida de plântulas de <i>A. angustifolia</i> por extração aquosa e fracionada por DEAE-Trysacyl (eluição aquosa) (fração MPP1-I[H <sub>2</sub> O]).. .....	59
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN da fração MPP1-I[H <sub>2</sub> O], apresentando em a) <sup>13</sup> C-RMN da região de 20 a 110 ppm e b) <sup>1</sup> H-RMN da região de 1 a 5 ppm .....	60
<b>Figura 19.</b> Perfil de eluição (HPSEC) da fração de pectina MPP1-I[0,2M] de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	62

<b>Figura 20.</b> Espectros de RMN da fração MPP1-I[0,2M]. a) $^{13}\text{C}$ -RMN da região de 10 a 110 ppm; b) $^{13}\text{C}$ -RMN de C-6 do ácido urônico; c) $^{13}\text{C}$ -RMN da região anomérica .....	64
<b>Figura 21.</b> Perfil de eluição (HPSEC) da fração de pectina MPP1-I[0,2M] de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	65
<b>Figura 22.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações MPP4-I[H <sub>2</sub> O], MPP5-I[H <sub>2</sub> O], MPP6-I[H <sub>2</sub> O], MPP7-I[H <sub>2</sub> O], MPP8-I[H <sub>2</sub> O] e MPP10-I[H <sub>2</sub> O] .....	67
<b>Figura 23.</b> Espectro de correlação $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ (HMQC) da região anomérica da fração MPP5-I[H <sub>2</sub> O] .....	70
<b>Figura 24.</b> Perfil de eluição (HPSEC) da fração MPP10-I[H <sub>2</sub> O], referente a porção inferior dos caules de <i>A. angustifolia</i> .....	71
<b>Figura 25.</b> Perfil de eluição (HPSEC) da fração MPP7-I[H <sub>2</sub> O], obtida dos caules de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	73
<b>Figura 26.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações A-6 a A-10, obtidas por extração com KOH (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mol/L), respectivamente, em xilema de <i>A. angustifolia</i> .....	78
<b>Figura 27.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com KOH 0,25 mol/L (A-6) e KOH 4 mol/L (A-10) de <i>A. angustifolia</i> e fração extraída diretamente com KOH 1 mol/L (KOH1a), de <i>P. lambertii</i> .....	78
<b>Figura 28.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN da AGX da fração obtida por extração com KOH 0,25 mol/L da holocelulose de <i>A. angustifolia</i> (fração A-6) (solubilizada em D <sub>2</sub> O) .	82

<b>Figura 29.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações deslignificadas de <i>P. lambertii</i> (fração KOH1a) e não-deslignificadas, de <i>P. selowii</i> (fração PS) .....	84
<b>Figura 30.</b> Perfil de eluição (HPSEC) da arabinoxilana de <i>P. lambertii</i> , extraída com KOH 1 mol/L (fração KOH1a) e seu tratamento com CETAVLON (fração KOH1a-cetavlon) .....	85
<b>Figura 31.</b> Perfil de eluição (HPSEC) da arabinoxilana de <i>P. lambertii</i> , extraída com KOH 1 mol/L (fração KOH1a) e seu tratamento com Ba(OH) <sub>2</sub> (fração KOH1a-bário) .....	85
<b>Figura 32.</b> Perfil de eluição (HPSEC) da fração de GGM, obtida por extração com NaOH 4 mol/L da holocelulose de <i>A. angustifolia</i> (fração A-12) .....	87
<b>Figura 33.</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN da GGM (fração A-12) de <i>A. angustifolia</i> , em NaOD 1%. .....	89
<b>Figura 34.</b> Composição monossacarídica das frações extraídas com <b>a)</b> água (fração MPP1), <b>b)</b> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> insolúvel em água (fração MPP2) e <b>c)</b> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> solúvel em água (fração MPP3), para as porções superior, média e inferior dos caules de <i>A.angustifolia</i> .....	93
<b>Figura 35.</b> Composição monossacarídica das frações extraídas com <b>a)</b> KOH 0,25 mol/L (fração MPP4), <b>b)</b> KOH 0,5 mol/L (fração MPP5) e <b>c)</b> KOH 1,5 mol/L (fração MPP6), para as porções superior, média e inferior dos caules de <i>A.angustifolia</i> .....	94
<b>Figura 36.</b> Composição monossacarídica das frações extraídas com <b>a)</b> KOH 2 mol/L (fração MPP7) e <b>b)</b> KOH 4 mol/L (fração MPP8), para as porções superior, média e inferior dos caules de <i>A.angustifolia</i> .....	95

<b>Figura 37.</b> Composição monossacarídica das frações extraídas com <b>a) NaOH 1 mol/L</b> (fração MPP9) e <b>b) NaOH 4 mol/L</b> (fração MPP10), para as porções superior, média e inferior dos caules de <i>A. angustifolia</i> .....	96
<b>Figura 38.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com água (MPP1), para as porções superior (S), média (M) e inferior (I) de plântulas de <i>A. angustifolia</i> ..	99
<b>Figura 39.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 mol/L, solúveis em água (MPP3), nas porções superior (S), média (M) e inferior (I) de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	101
<b>Figura 40.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com KOH 0,5 mol/L (MPP5), nas porções média (M) e inferior (I) de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	102
<b>Figura 41.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com KOH 1,5 mol/L (MPP6), nas porções superior (S), média (M) e inferior (I) de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	103
<b>Figura 42.</b> Perfil de eluição de oligossacarídeos (HPLC), obtidos por hidrólise enzimática, das frações de xiloglucana MPP6-S[H <sub>2</sub> O], MPP6-I[H <sub>2</sub> O] .....	106
<b>Figura 43.</b> Espectro de fragmentação (modo positivo) dos oligossacarídeos de xiloglucana da fração MPP6-I[H <sub>2</sub> O] .....	107
<b>Figura 44.</b> HPSEC da fração extraída com NaOH 4 mol/L (MPP10-I) da porção inferior do caule (I) de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	108

<b>Figura 45.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações de GGM purificadas, a partir de extração com água (fração MPP1-I[H <sub>2</sub> O]), NaOH 4 mol/L (fração MPP10-I[H <sub>2</sub> O]) em plântulas e com NaOH 4 mol/L (fração A-12) em xilema de <i>A. angustifolia</i> .....	110
<b>Figura 46.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações de AGX, MPP6-I [0,2M] (plântulas) e A-10 (xilema) de <i>A. angustifolia</i> .....	111
<b>Figura 47.</b> Perfil de eluição (HPSEC) das frações de MPP7-I[0,2M] (plântulas) e A-10 (xilema) de <i>A. angustifolia</i> .....	112
<b>Figura 48.</b> Composição monossacarídica da parede celular de células de <i>A. angustifolia</i> cultivadas em meio sem 2,4-D .....	113
<b>Figura 49.</b> Composição monossacarídica da parede celular de células de <i>A. angustifolia</i> cultivadas em meio com 2,4-D .....	113
<b>Figura 50.</b> Composição de manose em células cultivadas de <i>A. angustifolia</i> cultivadas em meio na ausência e presença de 2,4D .....	115
<b>Figura 51.</b> Modelo representativo da parede de células em diferenciação (porção superior) de gimnosperma .....	118
<b>Figura 52.</b> Modelo representativo da parede de células em expansão (porção média do caule) de gimnosperma .....	119
<b>Figura 53.</b> Modelo representativo da parede de células maduras (porção superior do caule) de gimnosperma .....	120

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela I.</b> Hidrólise de Saeman das seções de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	49
<b>Tabela II.</b> Composição de açúcares neutros, dosagem de ácidos urônicos, proteínas e fenólicos totais das amostras obtidas da porção SUPERIOR dos caules de <i>A. angustifolia</i> .....	55
<b>Tabela III.</b> Composição de açúcares neutros, dosagem de ácidos urônicos, proteínas e fenólicos totais das amostras obtidas da porção MÉDIA dos caules de <i>A. angustifolia</i> .....	56
<b>Tabela IV.</b> Composição de açúcares neutros, dosagem de ácidos urônicos, proteínas e fenólicos totais das amostras obtidas da porção INFERIOR dos caules de <i>A. angustifolia</i> .....	57
<b>Tabela V.</b> Sinais correspondentes aos carbonos da fração MPP1-I[H <sub>2</sub> O], a partir de análise por <sup>13</sup> C-NMR .....	61
<b>Tabela VI.</b> Composição monossacarídica da fração MPP1-I[0,2M] e seu correspondente carboxi-reduzido .....	62
<b>Tabela VII.</b> Composição monossacarídica das frações MPP4-I [H <sub>2</sub> O] a MPP10-I [H <sub>2</sub> O], purificadas por DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup> (eluição em água) .....	67
<b>Tabela VIII.</b> Monossacarídeos parcialmente metilados da fração MPP5-I[H <sub>2</sub> O] .....	68
<b>Tabela IX.</b> Análise dos monossacarídeos parcialmente metilados da fração (MPP10-I[H <sub>2</sub> O]) de GGM de <i>A. angustifolia</i> , obtida por extração com KOH 4 mol/L e fracionada com DEAE-Trysacryl (eluição com água).....	72



<b>Tabela X.</b> Análise dos monossacarídeos parcialmente metilados da fração MPP7-1[H <sub>2</sub> O] de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	73
<b>Tabela XI.</b> Determinação da composição de açúcares neutros das hemiceluloses e dosagem de ácidos urônicos e fenólicos do xilema de <i>A. angustifolia</i> .....	77
<b>Tabela XII.</b> Análise dos monossacarídeos parcialmente metilados das arabinoxilanas ácidas de <i>A. angustifolia</i> (frações A-6 e A-10) e <i>P. lambertii</i> (KOH1a) .....	81
<b>Tabela XIII.</b> Determinação dos sinais correspondentes aos carbonos da fração A-6, a partir de análise por <sup>13</sup> C-NMR .....	83
<b>Tabela XIV.</b> Análise dos monossacarídeos parcialmente metilados das frações de GGM de <i>A. angustifolia</i> (fração A-12) e <i>P. lambertii</i> (fração NaOH-a) .....	88
<b>Tabela XV.</b> Determinação dos sinais correspondentes aos carbonos da fração A-12, a partir de análise por <sup>13</sup> C-NMR .....	89

---

## FLUXOGRAMAS

---

<b>Fluxograma I.</b> Obtenção de material de parede primária (MPP), a partir de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	30
<b>Fluxograma II.</b> Obtenção de polissacarídeos do material de parede primária, a partir de plântulas de <i>A. angustifolia</i> .....	31
<b>Fluxograma III.</b> Extrações sequenciais de material de parede secundária, em xilema de <i>A. angustifolia</i> .....	33
<b>Fluxograma IV.</b> Preparo de lâminas de <i>Araucaria angustifolia</i> , para microscopia óptica .....	35

---

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

$^{13}\text{C}$ -RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
$^1\text{H}$ -RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
$\alpha$	Anomericidade do tipo alfa
$\beta$	Anomericidade do tipo beta
AcOH	Ácido acético
AGX	Arabino 4-O-metilglucuronoxilana
Ara	Arabinose
AU	Ácidos urônicos
CETAVLON	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
dn/dc	Taxa de variação do índice de refração com a concentração
D	Configuração monossacarídica do tipo D
D <sub>2</sub> O	Óxido de deutério – água deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GC-MS	Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa
GLC	Cromatografia líquido-gasosa
Glc	Glucose
GGM	Galactoglucomanana
HPAEC-PAD	Cromatografia de troca iônica de alta eficiência com detecção por pulso amperométrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC	Cromatografia líquida de alta eficiência por permeação em gel
L	Configuração monossacarídica do tipo L
Man	Manose
MeOH	Metanol
M <sub>w</sub>	Massa molecular ponderal média

NaBH <sub>4</sub>	Boroidreto de sódio
NaOD	Hidróxido de sódio deuterado
ppm	Partes por milhão
Rha	Ramnose
Rib	Ribose
TR	Tempo de retenção
Xyl	Xilose

---

### Siglas das frações

Frações	Tratamento	Tecido/espécie
MPP1-S	H <sub>2</sub> O	} Porção superior –plântulas de <i>A. angustifolia</i>
MPP2-S	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 mol/L	
MPP3-S	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 mol/L	
MPP4-S	KOH 0,25 mol/L	
MPP5-S	KOH 0,5 mol/L	
MPP6-S	KOH 1,5 mol/L	
MPP7-S	KOH 2 mol/L	
MPP8-S	KOH 4 mol/L	
MPP9-S	NaOH 1 mol/L	
MPP10-S	NaOH 4 mol/L	
MPP1-M	H <sub>2</sub> O	} Porção média –plântulas de <i>A. angustifolia</i>
MPP2-M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 mol/L	
MPP3-M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 mol/L	
MPP4-M	KOH 0,25 mol/L	
MPP5-M	KOH 0,5 mol/L	
MPP6-M	KOH 1,5 mol/L	
MPP7-M	KOH 2 mol/L	
MPP8-M	KOH 4 mol/L	
MPP9-M	NaOH 1 mol/L	
MPP10-M	NaOH 4 mol/L	
MPP1-I	H <sub>2</sub> O	} Porção inferior –plântulas de <i>A. angustifolia</i>
MPP2-I	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 mol/L	
MPP3-I	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 mol/L	
MPP4-I	KOH 0,25 mol/L	
MPP5-I	KOH 0,5 mol/L	
MPP6-I	KOH 1,5 mol/L	
MPP7-I	KOH 2 mol/L	
MPP8-I	KOH 4 mol/L	
MPP9-I	NaOH 1 mol/L	
MPP10-I	NaOH 4 mol/L	

Frações	Tratamento	Tecido/espécie
A-6	KOH 0,25 mol/L	Holocelulose de xilema de <i>A. angustifolia</i>
A-7	KOH 0,5 mol/L	
A-8	KOH 1 mol/L	
A-9	KOH 2 mol/L	
A-10	KOH 4 mol/L	
A-11	NaOH 1 mol/L	
A-12	NaOH 4 mol/L	
KOH1a	KOH 1 mol/L	Holocelulose de xilema de <i>P. lambertii</i>
PS	KOH 4 mol/L	Xilema de <i>P. selowii</i>

### Siglas das frações purificadas

Frações originais	Tratamento	Concentrações	Frações purificadas
MPP1-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	MPP1-I[H <sub>2</sub> O]
MPP1-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	NaCl 0,2 mol/L	MPP1-I[0,2M]
MPP1-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	NaCl 2 mol/L	MPP1-I[2M]
MPP4-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	MPP4-I[H <sub>2</sub> O]
MPP5-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	MPP5-I[H <sub>2</sub> O]
MPP6-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	MPP6-I[H <sub>2</sub> O]
MPP6-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	NaCl 0,2 mol/L	MPP6-I[0,2M]
MPP6-S	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	MPP6-S[0,2M]
MPP7-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	MPP7-I[H <sub>2</sub> O]
MPP7-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	NaCl 0,2 mol/L	MPP7-I[0,2M]
MPP8-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	MPP8-I[H <sub>2</sub> O]
MPP10-I	DEAE-Trysacryl Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	MPP10-I[H <sub>2</sub> O]
KOH1a	CETAVLON	10 mg/mL	KOH1a-cetavlon
KOH1a	Ba(OH) <sub>2</sub>	Saturado	KOH1a-bário

# **1. Introdução**

---

Uma das mais significativas diferenças entre uma célula de planta e uma célula animal é que a célula vegetal apresenta-se envolvida por uma parede em praticamente todas as etapas de seu desenvolvimento (BRETT e WALDRON, 1990). A parede celular, de acordo com WILSON et al. (2000), é uma elaborada matriz extracelular que circunda cada célula de um organismo.

Funções específicas são atribuídas à parede celular, como sustentação, elaboração de formato característico à célula, proteção contra ataque de patógenos e participação na comunicação célula-célula (BRETT e WALDRON, 1990; COSGROVE, 1986; FRY, 1986; WHITNEY et al., 1999). Possivelmente, esta multiplicidade de funções esteja associada à grande complexidade de sua estrutura. A ultraestrutura da parede celular de vegetais superiores compreende uma camada intercelular, composta por camadas de constituição química e anatômica distintas, sendo separadas em parede primária e parede secundária (ALBERSHEIM, 1978; HIGUCHI, 1997).

### **1.1. Parede primária**

A parede primária é uma fina camada produzida a partir da divisão celular, sendo composta basicamente de celulose, hemiceluloses, substâncias pécnicas e proteínas. Confere rigidez e força com investimento relativamente pequeno em material (JARVIS e McCANN, 2000). Sua extraordinária complexidade estrutural é evidenciada pela diversidade de polissacarídeos e glicoproteínas (McNEIL et al., 1984), de arquitetura precisamente regulada (SCHINDLER, 1998), sendo muitas vezes considerada um mecanismo exemplar de engenharia (ROSE e BENNETT,



1999). É composta de aproximadamente 90% de polissacarídeos e 10% de proteínas, sendo estas últimas pertencentes ao conjunto de glicoproteínas, moléculas particularmente presentes na parede primária (FOSKET, 1994).

Uma das mais relevantes tarefas desempenhadas pela parede celular primária é sua capacidade de expansão, em resposta à pressão de turgor exercida dentro da própria célula (JARVIS e McCANN, 2000; O'NEILL et al., 2001). O crescimento da parede ocorre sob aspecto temporal, iniciando-se por intensa divisão celular, de maneira relativamente lenta. Após cessar a atividade meristemática, segue a etapa de vacuolização celular, caracterizando o processo de expansão, acompanhado pela alteração na deposição de materiais de parede e ação específica de enzimas (COSGROVE, 2000). Estas enzimas seletivamente afrouxam a rede de polissacarídeos (COSGROVE, 2001), atuando principalmente na interação entre microfibrilas de celulose e cadeias de xiloglucanas (VARNER e LIN, 1989; CARPITA e GIBEAUT, 1993; MASON e COSGROVE, 1994; SCHINDLER, 1998; WHITHNEY et al., 1999).

Em recente trabalho, THOMPSON e FRY, 2001 descrevem que a ação coordenada de glicosidases e endoglicosidases promove a clivagem de polissacarídeos e uma consequente perda de interação entre os componentes da parede celular, compensada pela ação das transglicosilases, responsáveis pela reestruturação de segmentos de polissacarídeos. No caso da xiloglucana, a enzima candidata a possuir tal função é a XET (xiloglucana endotransglicosilase) (ROSE e BENNETT, 1999). Proteínas de parede denominadas extensinas também possuem uma função direta no mecanismo de catálise da extensão celular (MASON e COSGROVE, 1994).

Hipóteses sobre a arquitetura e dinâmica da expansão celular tiveram início na década de 70. Inicialmente, foi proposto que os componentes da matriz polimérica, consistindo de xilogucanas, polissacarídeos pécticos e proteínas estruturais estariam covalentemente ligados, formando uma gigantesca rede macromolecular, permanecendo as microfibrilas de celulose ligadas à matriz por pontes de hidrogênio apenas em alguns sítios de ligação. Esta discussão deu origem ao modelo de “Albersheim”, que descreve ainda a redução do pH resultando no enfraquecimento das pontes de hidrogênio, consequentemente levando ao afrouxamento das estruturas da parede (KEEGSTRA et al. 1973)

Mais tarde, HAYASHI (1989) e FRY (1989) propuseram que as microfibrilas de celulose seriam interconectadas por pontes de hidrogênio ao longo das cadeias de xiloglucanas. Polissacarídeos pécticos e proteínas participariam independentemente, envolvendo o complexo celulose-xiloglucana de maneira não-covalente. A idéia evoluiu para o modelo de “Carpita” (CARPITA e GIBEAUT, 1993), atualmente o mais aceito. Este aborda a arquitetura e dinâmica de crescimento da parede celular de dicotiledôneas referenciadas como parede celular do tipo I, assim como de monocotiledôneas pertencentes a Ordem Poales (gramíneas), denominada pelos autores de parede do tipo II.

As paredes do tipo I seriam constituídas, fundamentalmente, por uma rede de microfibrilas de celulose de 5 a 15 nm de largura e espaçadas de 20 a 40 nm, enoveladas em forma de bobina. As fibras de celulose seriam envolvidas e interconectadas pelas cadeias de xiloglucanas. Outros polissacarídeos hemicelulósicos também podem ser encontrados, como (galacto)glucomananas, galactomananas, (1→3)β-D-glucanas e glucuronoarabinoxilanas, porém em

menores quantidades. Toda a rede de polissacarídeos estaria embebida em uma matriz péctica, formada principalmente por homogalacturonanas e ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I). Neste aspecto, o modelo apresenta três diferentes domínios de interação na parede: o primeiro domínio, formado pela rede celulose-xiloglucana, que estaria embebida em uma matriz de polissacarídeos pécticos, configurando o segundo domínio. O terceiro domínio consiste de proteínas estruturais.

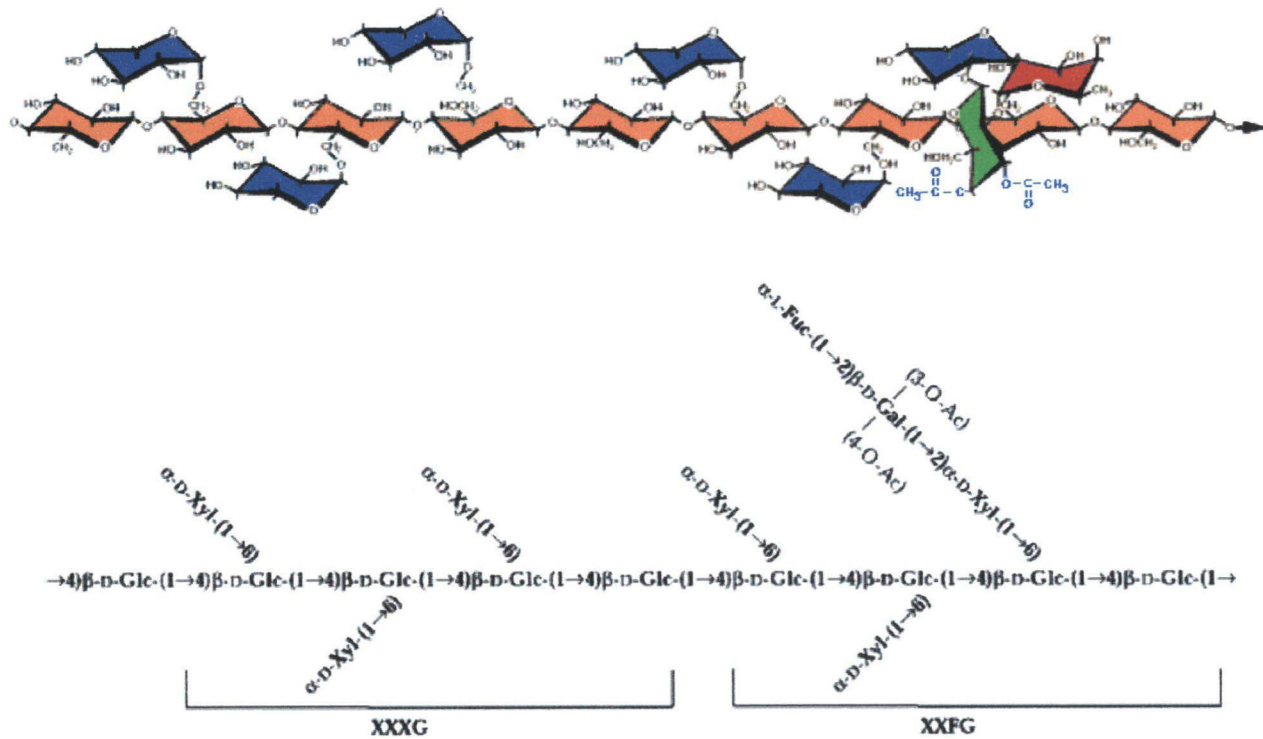
As paredes do tipo II são compostas pelas microfibrilas de celulose, envolvidas e interconectadas pelas cadeias de glucuronoarabinoxilanas, da mesma forma como ocorre com a xiloglucana, nas paredes do tipo I. As pectinas também encontram-se presentes, formadas pelas cadeias de ácido poligalacturônico e ramnogalacturonanana do tipo I (RG-I), com cadeias laterais podendo ser constituídas por arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas. Os principais polissacarídeos presentes na parede primária de vegetais superiores são destacados a seguir:

#### **a) Xiloglucanas**

Dentre os polissacarídeos hemicelulósicos comumente encontrados em paredes primárias, destacam-se as xiloglucanas, presentes tanto em dicotiledôneas (~20%) quanto em monocotiledôneas (~2%) (CHAMBAT, BARNOUD e JOSELEAU, 1984; DARVILL, 1980).

A estrutura básica das xiloglucanas consiste em uma cadeia principal de unidades de D-glucopiranose ligadas  $\beta(1\rightarrow4)$ , com substituições parciais de

unidades de D-xilopiranosose  $\alpha$ -ligadas em O-6 (Figura 1). Algumas destas unidades de D- $\alpha$ -xilopiranosose são substituídas por  $\beta$ -D-galactopiranosose em O-2. Estas, por sua vez, podem ser parcialmente substituídas por  $\alpha$ -L-fucopiranosose em O-2 (BAUER et al., 1973; DARVILL et al., 1980; BUCHANAN, GRUISSEM e JONES (2000).



**Figura 1.** Estrutura química parcial de uma xiloglucana de parede primária. Fonte: BUCHANAN, GRUISSEM e JONES (2000).

Em um dos poucos exemplos de estudo envolvendo parede primária de gimnospermas, ACEBES, MORAL e ZARRA (1993), investigando uma xiloglucana de hipocótilos de *Pinus pinaster*, identificaram uma estrutura altamente substituída (80%) em O-6 da cadeia principal, sugerindo que sua estrutura encontra-se mais próxima daquelas relatadas para angiospermas dicotiledôneas do que para

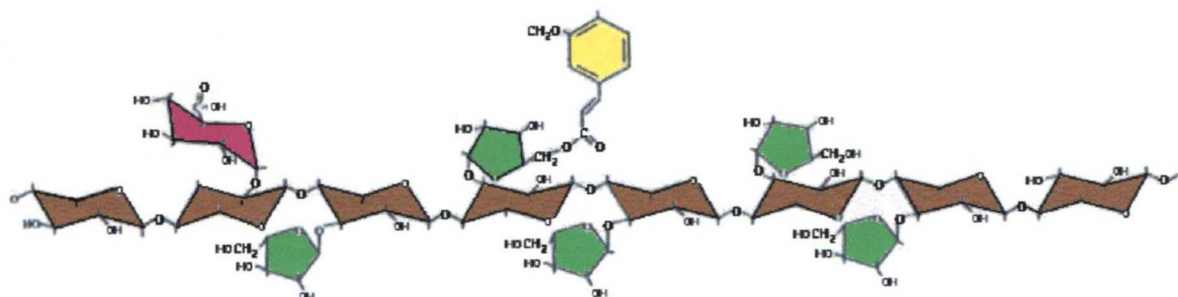
monocotiledôneas, uma vez que as xiloglucanas de dicotiledôneas apresentam maior grau de substituição que as monocotiledôneas (HAYASHI, 1989). KAKEGAWA, EDASHIGE e ISHII (1998), estudando os oligossacarídeos de xiloglucana da gimnosperma *Cryptomeria japonica*, também observaram um alto grau de substituição da cadeia principal.

Considerando que a parede celular primária de dicotiledôneas apresenta a xiloglucana como o principal polissacarídeo hemicelulósico, THOMAS et al. (1987) citaram que a parede primária de *Pseudotsuga menziesii*, uma gimnosperma, apresenta uma predominância de xiloglucana, sugerindo a hipótese que a parede primária desta gimnosperma é similar àquelas de angiospermas dicotiledôneas. Entretanto, MOLLARD et al. (1997), investigando polissacarídeos da parede primária de células embriogênicas de *Pinus caribaea*, observaram que as xiloglucanas constituem apenas uma pequena porção da parede.

## **b) Xilanas**

As xilanas também são constituintes típicos de paredes primárias, ocorrendo em maior quantidade em monocotiledôneas que em dicotiledôneas, constituindo as paredes do tipo II. As estruturas conhecidas consistem em uma cadeia principal de unidades de D-xilopiranosose ligadas  $\beta(1\rightarrow4)$ . Os pontos de ramificações são usualmente encontrados em O-2 ( $\alpha$ -D-acido glucurônico) e O-2/O-3 ( $\alpha$ -L-arabinofuranose) das unidades da cadeia principal. O grau de substituição da cadeia principal por unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranose determina o

grau de solubilidade da molécula e seu potencial em ligar-se a celulose (McNEIL et al., 1975) (Figura 2).

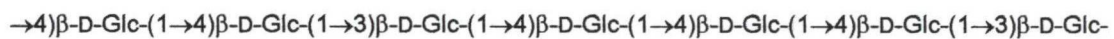
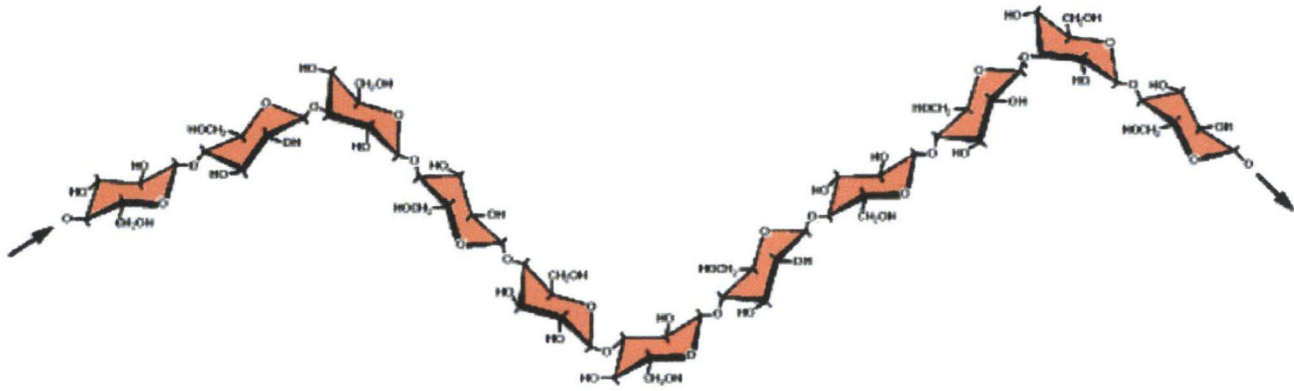


**Figura 2.** Estrutura química parcial de uma glucuronoarabinoxilana. Xilose (—), Arabinose (—), ácido glucurônico (—), ácido ferúlico (—) Fonte: CARPITA, McCANN e GRIFFING (1996).

Arabinoxilanas geralmente apresentam-se ligadas a unidades simples de compostos fenólicos. Dentre estes compostos, o ácido ferúlico é o mais frequentemente encontrado, principalmente em espécies de cereais (WILKIE, 1979).

### c) Glucanas

As  $\beta$ -glucanas não celulósicas (ou glucanas de ligação mista) são genericamente utilizados para designar D-glucanas ligadas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), alternadamente. São polímeros notadamente presentes em monocotiledôneas da família Poaceae (STINARD e NEVINS, 1980) (Figura 3), compondo as paredes celulares do tipo II.

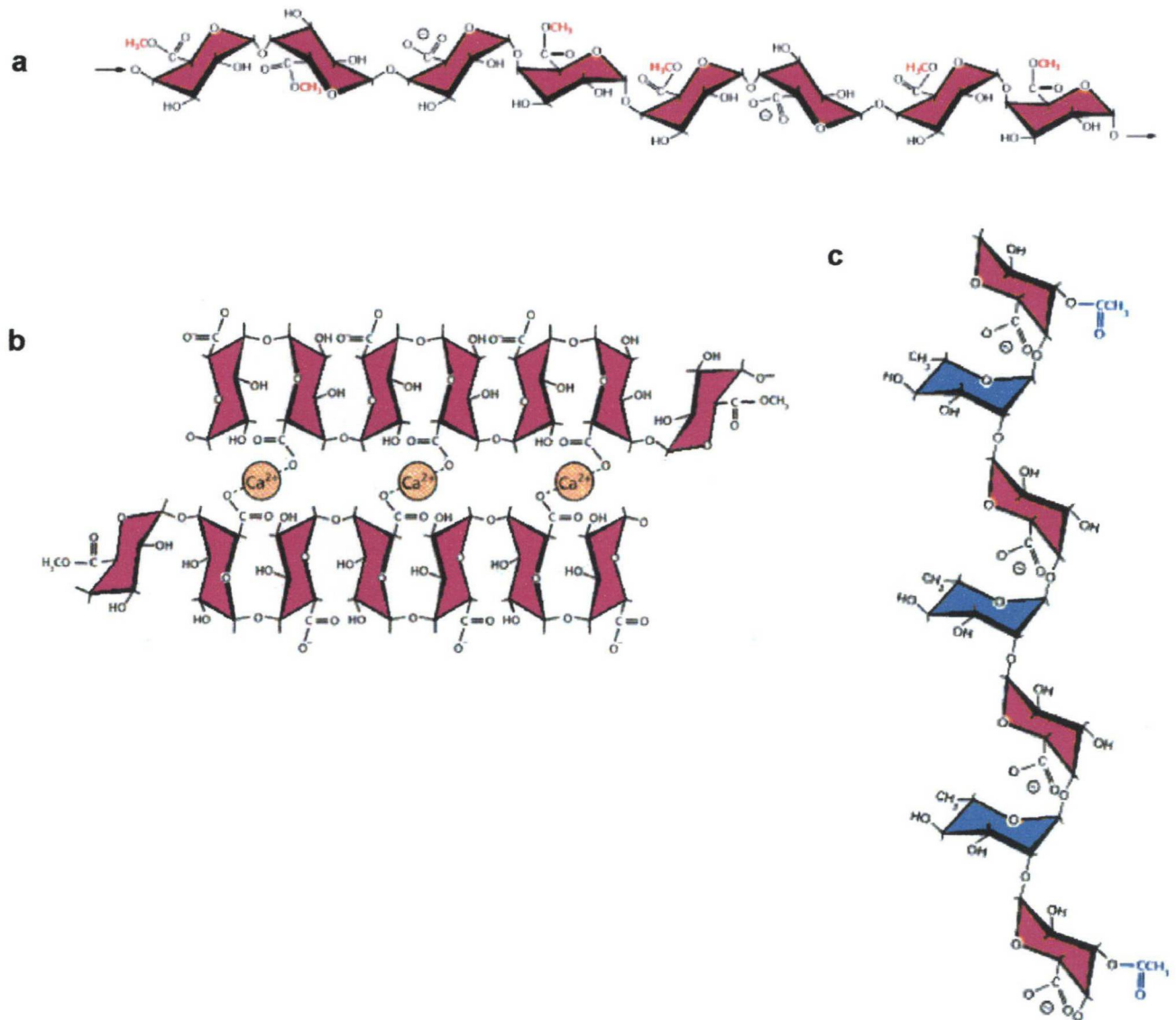


**Figura 3.** Estrutura química parcial de uma  $\beta$ -glucana. **Fonte:** BUCHANAN, GRUISSEM e JONES (2000).

#### d) Pectinas

Segundo ROBERTS (1990) e KEEGSTRA et al. (1973), os polissacarídeos pécnicos estão entre os polímeros mais complexos conhecidos, sendo responsáveis por muitas funções fisiológicas: determinar a porosidade da parede, promover superfícies carregadas que modulam o pH da parede e o balanço iônico e ainda funcionam como moléculas de reconhecimento que sinalizam o desenvolvimento de resposta a organismos simbiotes, patógenos e insetos. Estes polissacarídeos estruturais compõem cerca de 35% do peso seco de paredes celulares de angiospermas, sendo também abundantes nas gimnospermas (VARNER e LIN, 1989). São polissacarídeos com alto teor de unidades ácidas, ocorrem nas paredes primárias como homogalacturonanas

(Figura 4a), predominantemente constituídas por unidades de ácido D-galacturônico ligadas glicosidicamente  $\alpha(1\rightarrow4)$ .



**Figura 4.** Estrutura química parcial de a) homogalacturonana metil-esterificada; b) formação de uma rede de pectinas envolvendo ligações iônicas de regiões não-esterificadas ( $\text{COO}^-$ ) por ions cálcio; c) ramnogalacturonana tipo I (RG-I). Ácido galacturônico (—), Rhamnose (—) Fonte: BUCHANAN, GRUISSEM e JONES (2000).



As homogalacturonanas são sujeitas a alterações em sua conformação e em suas propriedades de ligações com a parede celular. Muitas das unidades esterificadas por grupamentos metil durante a biossíntese são removidos por metil esterases (MICHELI, 2001), conseqüentemente aumentando a densidade de cargas e favorecendo a ligação por ions cálcio (Figura 4b). Os pectatos de cálcio, caracteristicamente, formam géis que, após o processo de secagem, apresentam baixa solubilidade em água (McNEIL et al., 1984).

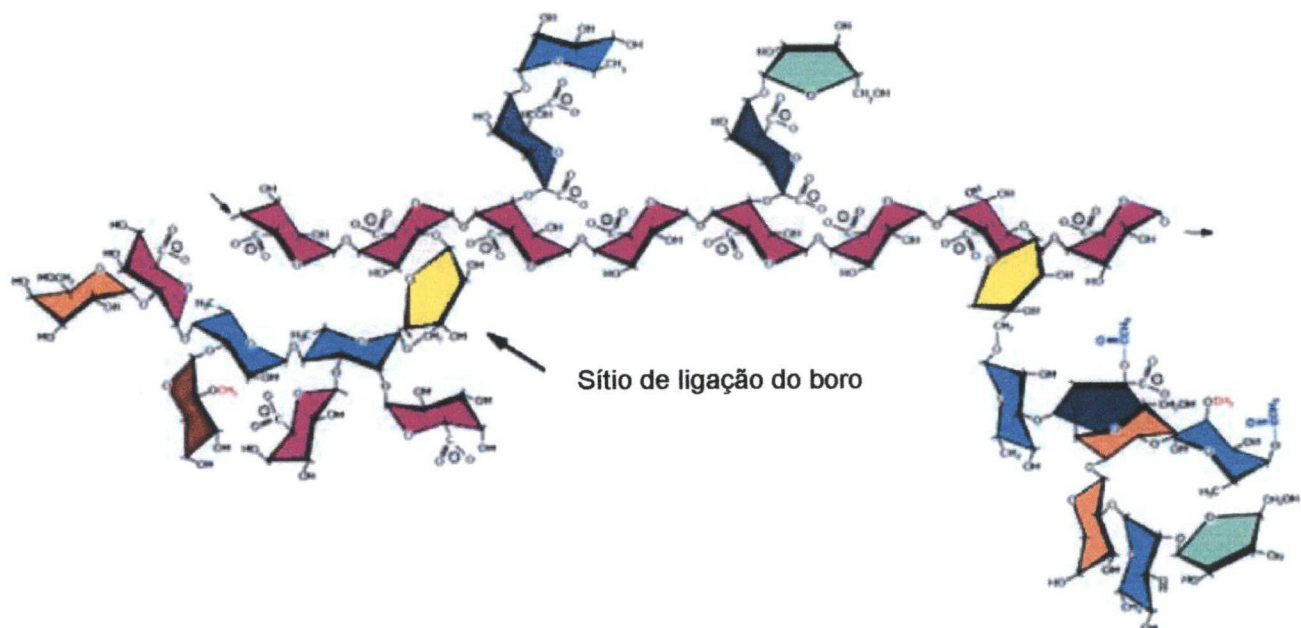
A ramnogalacturonana tipo I (RG-I), polissacarídeo péctico muito estudado e de grande ocorrência dentro das pectinas, é composta por uma cadeia principal de unidades alternadas de ácido D-galacturônico O-2 ligadas e L-ramnose O-4 ligadas (McNEIL, DARVILL e ALBERSHEIM, 1982; THOMAS, DARVILL e ALBERSHEIM, 1989) (Figura 4c). A cadeia lateral é variável, podendo apresentar unidades de D-galactose, L-arabinose e L-fucose.

Cadeias de galactanas são também encontradas substituindo lateralmente as RG-I, sendo mais evidente a presença de galactanas com estrutura linear composta por ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ , embora existam registros de galactanas substituídas em O-6 (EDA e KATO, 1978). Arabinanas lineares ligadas  $\alpha(1\rightarrow5)$  são também frequentemente encontradas substituindo a cadeia principal de RG-I (DARVILL et al., 1980; ORFILA et al., 2001).

As arabinogalactanas tipo I, principais polissacarídeos substituintes das RG-I, são polímeros normalmente solúveis em água, possuem uma estrutura principal de unidades de D-galactose ligadas  $\beta(1\rightarrow4)$ , com substituições de L-arabinose em O-3 (WILKIE, 1979) (Figura 5).



As RG-II estão presentes em todos os vegetais superiores, principalmente na forma de um dímero, covalentemente ligado por um diéster borato (ISHII et al., 1999 e 2001; RIDLEY, O'NEILL e MOHNEN, 2001) nas unidades de apiose de cada estrutura monomérica (BUCHANAN, GRUISSEM e JONES, 2000) (Figura 7). Recentes evidências têm sugerido que a presença do íon boro é essencial para a manutenção da arquitetura da parede celular (KOBAYASHI et al., 1999; O'NEIL et al., 2001).



**Figura 7.** Estrutura química parcial de uma ramnogalacturonana tipo II. (—) Apiose; (—) 2-Metilxilose; (—) Fucose; (—) Ácido galacturônico; (—) Arabinose; (—) Ácido acérico; (—) Glucose. Fonte: BUCHANAN, GRUISSEM e JONES (2000).

### e) Proteínas estruturais

A parede celular possui algumas classes de proteínas estruturais. Segundo KIELISZEWSKI e LAMPORT (1987), conceitualmente, existem três planos de orientação dos componentes da parede celular do tipo I: o arranjo das microfibrilas no eixo transversal; *ligações cruzadas* por moléculas de xiloglucana no eixo longitudinal e *ligações cruzadas* das microfibrilas pelas proteínas estruturais, orientadas radialmente.

Dentre as proteínas estruturais, a mais estudada em gimnospermas é a família das glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (“hidroxiprolina-rich glycoproteins” - HRGP’s) genericamente denominadas de extensinas (O’NEIL e SELVENDRAN, 1980; McNEIL et al., 1984; FONG et al., 1992; FOSKET, 1994). São as proteínas que ocorrem em maior quantidade na parede celular. Devido ao alto conteúdo de lisina, apresentam caráter básico (ponto isoelétrico em torno de 10).

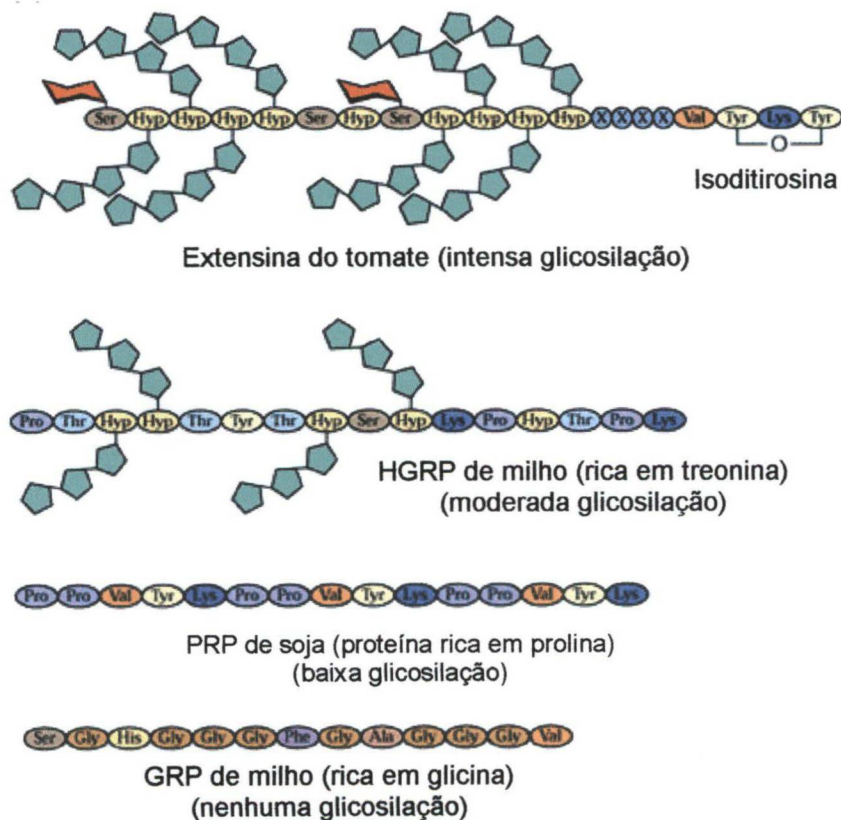
Os resíduos de hidroxiprolina são tipicamente glicosilados com um a quatro unidades de arabinose, possuindo estruturas repetitivas assumindo, de maneira geral, uma estrutura helicoidal, como bastões flexíveis (VARNER e LIN, 1989). São comumente associados a células de câmbio, parênquima de floema e vários tipos de esclerênquima (TAIZ e ZEIGER, 2002).

Sintetizadas como proteínas solúveis, tornam-se progressivamente insolúveis na parede devido às ligações intermoleculares de resíduos de tirosinas em monômeros adjacentes, ligação esta denominada isoditirosina (Figura 8).

KIELISZEWSKI et al. (1992), identificaram uma extensina de gimnosperma (*Pseudotsuga menziesii*), ressaltando a presença de dois peptídeos com cinco

aminoácidos (Hyp-Hyp-Val-Tyr-Lys; Pro-Pro-X-X-Lys), com sua sequência homóloga àquelas tipicamente encontradas em angiospermas, como tomate e feijão. Os autores apresentam ainda, uma sequência periódica de 45 aminoácidos para a extensina caracterizada de *Pseudotsuga menziesii*.

Outros polipeptídeos estruturais encontrados em vegetais são aqueles ricos em glicina (“glycine-rich proteins” - GRP’s) e ricos em prolina (“proline-rich proteins” - PRP’s), ambos frequentemente encontrados no xilema e, conseqüentemente, associados a parede celular em estágio final de diferenciação (TAIZ e ZEIGER, 2002). Podem ainda apresentar diferentes graus de glicosilação, conforme mostrado na Figura 8 (BUCHANAN, GRUISSEM e JONES, 2000).



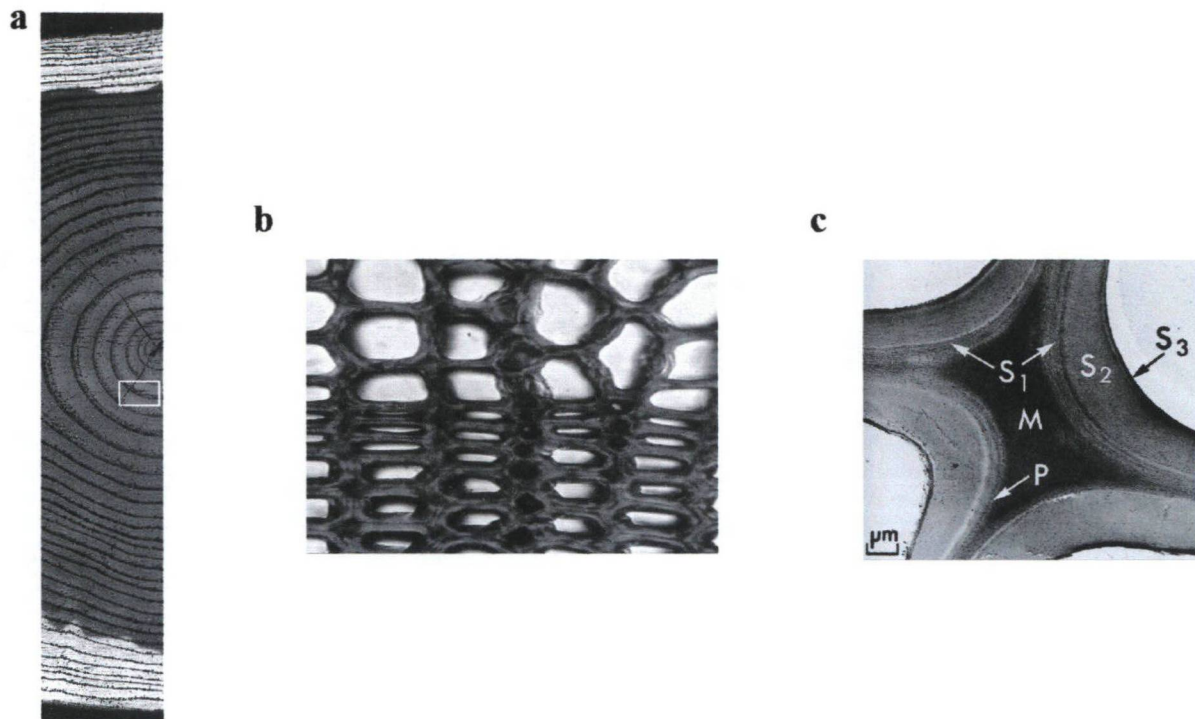
**Figura 8.** Estruturas propostas para porções de proteínas estruturais de paredes primárias de diversas espécies. Fonte: BUCHANAN, GRUISSEM e JONES (2000)

Além das proteínas estruturais, existe uma outra classe de proteínas denominadas arabinogalactanas-proteínas (“arabinogalactan proteins” - AGP’s), encontradas nas membranas celulares e matriz extracelular de vegetais superiores (KREUGER e HOLST, 1993). AGP’s são consideradas proteoglicanas, sendo constituídas por menos de 10% de proteínas e mais de 90% de carboidratos (KREUGER e HOLST, 1996). Apresentam função de adesão e sinalização durante a diferenciação celular (TAIZ e ZEIGER, 2002).

## **1.2. Parede secundária**

Quando cessa o processo de expansão celular, em muitas células vegetais, ocorre a síntese de uma parede secundária (EMONS e MULDER, 2000), que representa uma evolução adaptativa das plantas às suas necessidades de competir pela luz (JARVIS e McCANN, 2000). A parede secundária é uma espessa camada depositada sobre a parede primária, consistindo de uma camada externa (S1), camada média (S2) e uma camada interna (S3), cada qual com uma orientação própria das microfibrilas de celulose (FENGEL e WEGENER, 1989; HIGUCHI, 1997; SJÖSTRÖM, 1993).

Iniciada no momento em que cessa a expansão da parede celular primária (COSGROVE, 2001), a parede secundária deposita-se na forma de um cilindro, em torno da parede primária pré-existente (EMONS e MULDER, 1998). Compõe cerca de 90% da parede celular em espessura (SJÖSTRÖM, 1993) (Figura 9), sendo majoritariamente constituída pelas microfibrilas de celulose, entre as quais encontram-se localizadas porções de lignina e hemiceluloses (SJÖSTRÖM, 1993).



**Figura 9.** Fotografias da parede celular de coníferas evidenciando a) o aspecto geral da madeira de *Pinus nigra*; b) anatomia dos traqueóides axiais e c) diferenciação das paredes primária e secundária. M, lamela média; P, parede primária; S1, S2 e S3, camadas da parede secundária. Fontes: a) e b) PLOMION, LEPREVOT e STOKES, 2001; c) SJÖSTROM, 1993.

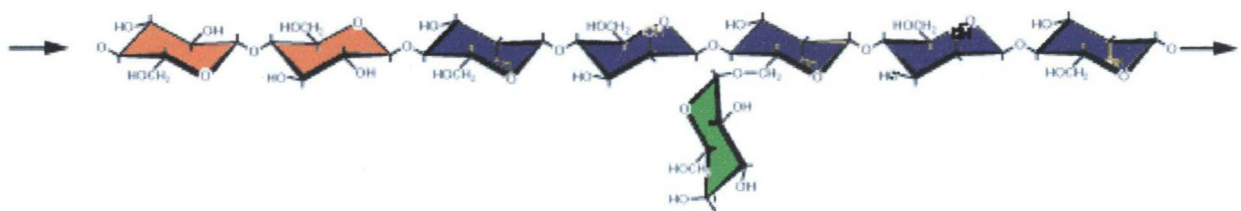
Considerando que os aspectos anatômicos (BURGER e RICHTER, 1992; SJÖSTRÖM, 1993) e constitutivos (FENGEL e WEGENER, 1989) entre espécies de gimnospermas e angiospermas são distintos, com relação ao tamanho, forma, estrutura da parede, textura e composição (MELLEROWICZ, 2001), a formação da parede secundária deve ser dirigida pela expressão coordenada de numerosos genes, especificamente envolvidos com as enzimas responsáveis pela biossíntese, interação e deposição de hemiceluloses, ligninas e pectinas, para os

diferentes grupos vegetais (MELLEROWICZ, 2001; PLOMION, LEPREVOST e STOKES, 2001; TURNER, TAYLOR e JONES, 2001).

As principais hemiceluloses da parede secundária de gimnospermas são galactoglucomananas e menores quantidades de arabinoxilanas ácidas (SJÖSTRÖM, 1993), enquanto as angiospermas apresentam majoritariamente xilanas ácidas (REICHER, CORRÊA e GORIN, 1984; TIMELL, 1964).

### a) O-Acetil-galactoglucomanana (GGM)

Nas espécies de gimnospermas, são hemiceluloses que apresentam uma cadeia principal de unidades de manose e glucose alternadas ligadas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), eventualmente substituídas por galactose  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) e grupos O-acetil nas posições O-2 e/ou O-3 das unidades de manose (FENGEL e WEGENER, 1989) (Figura 10). A razão Man:Glc:Gal (3:1:0,1) é geralmente encontrada, podendo, no entanto, variar de acordo com a espécie e o método extrativo utilizado (FENGEL e WEGENER, 1989).



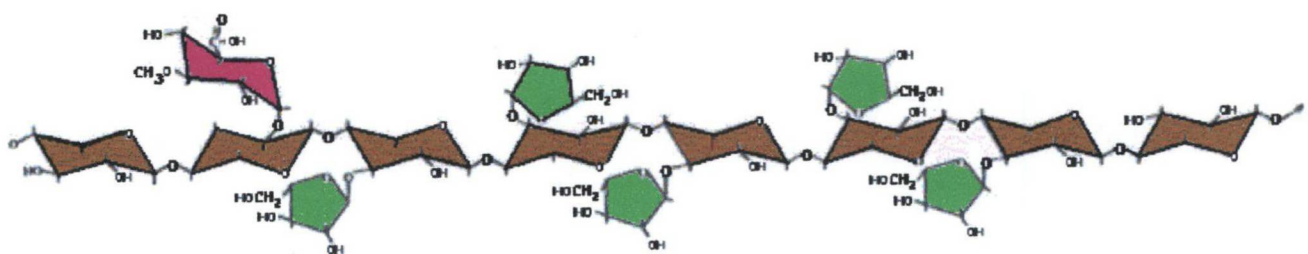
**Figura 10.** Estrutura química parcial de uma O-acetil-galactoglucomanana de gimnosperma. Manose ( — ), Glucose ( — ) e Galactose ( — ) Fonte: BUCHANAN, GRUISSEM e JONES (2000).



Trabalhos sobre a elucidação estrutural de glucomananas de parede de gimnospermas tiveram grande evidência a partir da década de 60 (CROON e LINDBERG, 1958; MEIER, 1965; TYMINSKI e TIMELL, 1960; KOOIMAN e ADAMS, 1961). Em algumas publicações mais recentes, técnicas mais modernas para determinação da estrutura fina, como RMN (KUBACKOVA, KARACSONYI e BILISICS, 1992; HAZENDONK et al., 1996; CAPEK et al. 2000) e FTIR (ZANUTTINI, CITRONI e MARTINEZ, 1998) foram utilizadas.

### b) Arabino-4-O-metilglucuronoxilana (AGX)

Em gimnospermas, as AGX são constituídas por uma cadeia principal de unidades de xilopirranose ligadas  $\beta(1\rightarrow4)$ , substituídas por  $\alpha(1\rightarrow3)$  arabinofuranose e ácido 4-O-metilglucurônico ligadas  $\alpha(1\rightarrow2)$  (Figura 11). Em angiospermas dicotiledôneas as unidades de xilopirranose são substituídas não mais por arabinose, mas por grupos acetil nas posições O-2 ou O-3, ou ainda em menor quantidade, substituições em O-2,3 (CARPITA e WHITTERN, 1986).



**Figura 11.** Estrutura química parcial de uma arabino-4-O-metilglucuronoxilana de gimnosperma. Xilose (—), Arabinose (—), ácido 4-O-metilglucurônico (—), Fonte: BUCHANAN, GRUISSEM e JONES (2000).

As hemiceluloses de madeiras de angiospermas também possuem uma similaridade em torno da composição e estrutura. Diferem substancialmente, no entanto, daquelas encontradas em gimnospermas. Estas últimas são constituídas basicamente por 4-O-metil glucuronoxilanas (cerca de 30% em massa seca de madeira), com percentuais inferiores de outros polissacarídeos. (FENGEL e WEGENER, 1989; PULS e SCHUSEIL, 1993; SJÖSTRÖM, 1993; TIMELL, 1964; TIMELL, 1965b). Em xilema de *Mimosa scabrella*, uma angiosperma dicotiledônea, a ocorrência de grupos O-acetil na cadeia de xilana indicou substituições em O-2 (14%), O-3 (16%) e O-2,3 (5%) (REICHER, CORRÊA e GORIN, 1984).

Arabinoxilanas ácidas são também encontradas abundantemente na parede celular de monocotiledôneas gramíneas (CARNACHAN e HARRIS, 2000). No entanto recentemente uma arabinoxilana neutra foi isolada e caracterizada em caule de *Cladium mariscus*, uma monocotiledônea comelinóide não-gramínea (BOCHICCHIO et al., manuscrito em preparação).

Considerando os substituintes em AGX, de forma geral, a cada dez unidades de xilose, cerca de sete são substituídas por unidades terminais de 4-O-metilglucurônico, enquanto que uma unidade terminal de arabinose ocorre a cada oito ou nove unidades de xilose (FENGEL e WEGENER, 1989; PULS e SCHUSEIL, 1993). Em hemiceluloses de xilemas, a presença de grupamentos 4-O-metil em unidades de ácidos urônicos é praticamente total. Em monocotiledôneas, como acontece na maioria das espécies, os ácidos urônicos não apresentam grupos O-metil ligados (CARPITA, McCANN e GRIFFING, 1996; ASPINALL, 1959; CARPITA e WHITTERN, 1986; WILKIE, 1983).

Arabinoxilanas ácidas, em angiospermas monocotiledôneas, diferem daquelas encontradas em dicotiledôneas. As primeiras são formadas por cadeias de unidades de xilopirranose ligadas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), substituídas por arabinofuranose  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) e/ou  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) e ácido glucurônico ligadas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2).

Assim como observado para os estudos envolvendo GGM, grande parte dos trabalhos envolvendo a elucidação estrutural das AGX de parede secundária de vegetais superiores teve seu início no final da década de 50, a partir da descoberta e aperfeiçoamento dos métodos químicos de análise. Em antigos trabalhos com madeiras de coníferas, os estudos de hemiceluloses dos gêneros *Picea*, *Gingko*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Thuja* e *Tsuga* evidenciaram uma similaridade em torno de suas estruturas químicas. Todas as espécies dos gêneros estudados apresentaram, como principal hemicelulose, O-acetil-galactoglucomananas e em menores quantidades, arabino-4-O-metilglucuronoxilanas, com diferentes razões entre os monossacarídeos constituintes (ADAMS, 1965a; ASPINALL, 1959; CROON e LINDBERG, 1958; DUTTON e HUNT, 1960; KOOIMAN e ADAMS, 1961; TYMINSKI e TIMELL, 1960). Outros trabalhos que se seguiram demonstraram o mesmo perfil estrutural, como no estudo da madeira de *Abies amabilis* (SCHWARZ e TIMELL, 1963) e *Picea engelmanni* (MILLS e TIMELL, 1963).

Embora as gimnospermas apresentem maiores quantidades de GGM em relação as AGX, foi observado em *Podocarpus lambertii*, uma gimnosperma nativa e abundante do sul do Brasil, que as quantidades de GGM e AGX são muito similares (BOCHICCHIO, 1999). Isto pode ser devido às características

morfológicas peculiares da espécie (KELCH, 1998), que sugerem uma aproximação evolutiva em relação às angiospermas, por exemplo, pela presença do epimácio, pseudofruto carnosos comparados a um perianto ou um segundo integumento do óvulo de uma gimnosperma (TOMLINSON, 1992). Aliado aos estudos de taxonomia clássica, estes resultados contribuem com uma avaliação quimiotaxonômica em torno da classificação do gênero *Podocarpus*.

Um estudo comparativo entre *Araucaria angustifolia*, a mais representativa gimnosperma brasileira e que apresenta características típicas deste grupo vegetal, com espécies do gênero *Podocarpus*, poderão fornecer importantes informações sobre a distribuição das hemiceluloses na parede secundária destes vegetais.

### **1.3. Gimnospermas nativas**

#### **a) *Araucaria angustifolia***

O gênero *Araucaria* pertence à divisão Pinophyta (antiga Gymnospermae), Ordem Coniferales e família Araucariaceae (JOLY, 1991). Dentre as poucas espécies de gimnospermas nativas do Brasil, *Araucaria angustifolia* (pinheiro-do-Paraná) é a mais representativa, caracterizando o tipo de formação fitogeográfica Floresta Ombrófila Mista (GOLFARI, 1971; CARVALHO, 1994). Espécie que habita os solos brasileiros desde a Era Mesozóica (cerca de 200 milhões de anos), atualmente habita preferencialmente os Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio

Grande do Sul, com pequenas áreas de ocorrência no sul de São Paulo até o sul de Minas Gerais, nas regiões mais elevadas.

Planta dióica de 20-50 m de altura, com tronco retilíneo, de 90-180 cm de diâmetro. Folhas coriáceas, de 3-6 cm de comprimento. A árvore jovem possui forma piramidal e bem diferente da adulta, apresentada na Figura 12. Floresce nos meses de setembro-outubro e a maturação dos frutos ocorre nos meses de abril-maio (LORENZI, 1992).

Com massa específica considerada média (0,50 a 0,61 g/cm<sup>3</sup>) (PEREIRA e MAINIERI, 1957), a madeira de *Araucaria angustifolia* pode ser utilizada para construções em geral, de alta qualidade, móveis, laminados, guarnições e compensados, entre outros inúmeros empregos. O pinheiro-do-Paraná, sob a forma de madeira serrada e laminada foi, por um longo período, um dos produtos mais importantes na exportação brasileira. Fornece celulose de fibra longa, rendendo papel de alta qualidade (CARVALHO, 1994). Em função de sua excelente qualidade, durante décadas sofreu intensa e indiscriminada exploração, sendo atualmente uma espécie protegida e amplamente estudada na conservação, manejo florestal e recuperação de áreas degradadas. No entanto, pesquisas da madeira desta espécie representativa do sul do Brasil ainda necessitam de investigações.

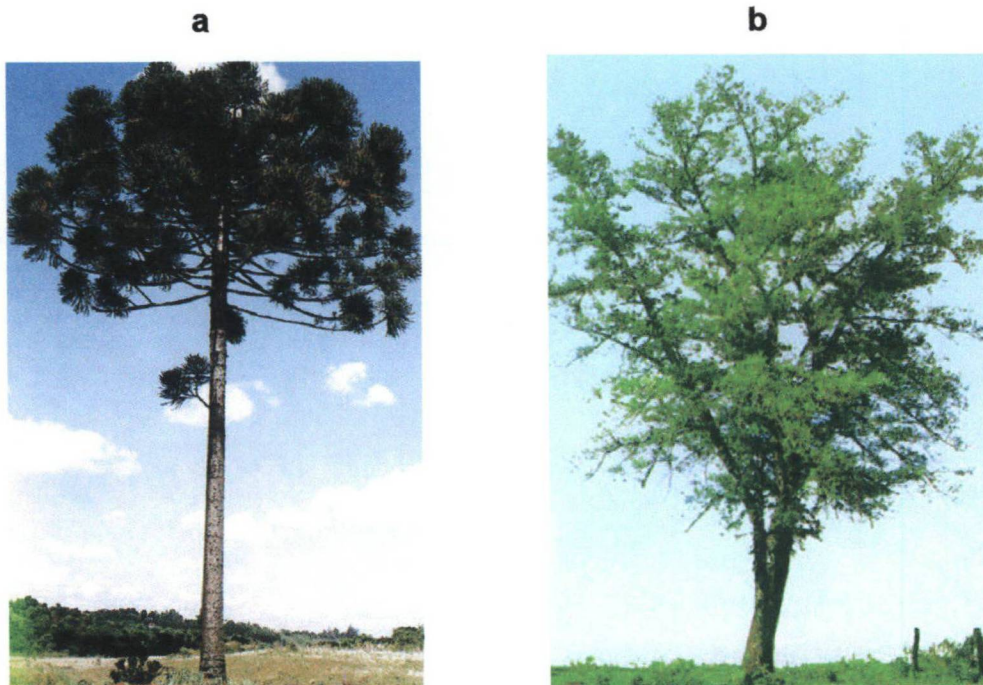
**b) *Podocarpus sp.***

As espécies da família Podocarpaceae são, morfológicamente e ecologicamente, a mais diversa de todas as coníferas (KELCH, 1998). Apresentam características incomuns às gimnospermas, como a formação do epímácio, um envoltório carnoso unido ao cone (JOLY, 1991) ou estrutura de suporte do óvulo (KELCH, 1998), característica que provoca, há vários anos, controvérsias em torno de seu processo evolutivo dentro das gimnospermas e sua real classificação botânica. FLORIN (1954) interpreta o cone como sendo homólogo à escala ovulífera de outras coníferas, como da família Pinaceae. No entanto, *Podocarpus* lança uma controvérsia, quando se considera o epímácio como um segundo integumento do óvulo de angiospermas (KELCH, 1998; TOMLINSON, 1992).

O gênero *Podocarpus* é um representante da família Podocarpaceae, ordem Coniferales e divisão gimnosperma (JOLY, 1991). Dentre as oito espécies encontradas no Brasil, *Podocarpus lambertii* é a de maior ocorrência (Figura 5), sendo que no Paraná, aparece de forma dispersa, formando maciços puros, com elevado número de indivíduos por unidade de área (INOUE, RODERJAN e KUNIYOSHI, 1984; MAINIERI e PIRES, 1973). *P. lambertii* habita preferencialmente a Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), nas formações Aluvial (galeria), Montana e Alto-Montana. É encontrada também na Floresta Estacional Decidual Montana, na região central da Bahia, nos Campos rupestres ou de altitude e na Estepe Gramíneo-Lenhosa, onde se dá o início da

formação dos capões de mata (CARVALHO, 1994; INOUE, RODERJAN e KUNIYOSHI 1984).

Outra espécie do gênero, nativa do Estado do Paraná é *Podocarpus selowii*, porém com ocorrência bastante reduzida quando comparada com *P. lambertii*. Esta se encontra na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) e na Floresta Amazônica (JOLY, 1991; MAINIERI e PIRES, 1973). As características morfológicas e reprodutivas de *P. selowii* são muito semelhantes à *P. lambertii*, exceto a dimensão foliar, que atinge de 5-9 cm de comprimento (MAINIERI e PIRES, 1973).



**Figura 12.** Fotografia de a) *Araucaria angustifolia* e b) *Podocarpus lambertii*. Fonte: LORENZI, 1992.

#### **1.4. Justificativas**

O estudo da estrutura fina de parede primária e secundária de gimnospermas contemplam uma lacuna de muitos anos de pesquisa, visto que todos os modelos de arquitetura da parede celular de vegetais associam-se a espécies de angiospermas mono e dicotiledôneas.

A parede primária, com sua extraordinária capacidade de expansão e, portanto, constante modificação de sua complexa composição polimérica, determina um enorme desafio no entendimento deste dinâmico processo da formação da parede celular.

A parede secundária foi originada durante o processo evolutivo para fornecer resisitência à parede celular de vegetais que investem em altura, na busca de luminosidade, apresentando enorme diversidade de estruturas anatômicas associadas aos diferentes grupos vegetais. Os estudos das estruturas químicas de polissacarídeos da parede secundária de gimnospermas ainda ressentem de maiores investigações quanto sua distribuição em torno da parede celular e as possíveis interações moleculares referentes a estes polissacarídeos.

O presente estudo poderá contribuir, futuramente, com o entendimento das relações associadas com as mudanças dinâmicas ocorridas na parede celular primária e secundária, além de determinar a estrutura fina dos polissacarídeos de gimnospermas.



## **2. Objetivos**

---

### **Objetivos gerais**

Investigar as estruturas dos principais polissacarídeos da parede primária e secundária de *Araucaria angustifolia*, observar possíveis interações moleculares, avaliar as modificações destes componentes durante a formação da parede celular e comparar seus aspectos estruturais com outras gimnospermas nativas, *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus selowii*.

### **Objetivos específicos**

- Extrair pectinas e hemiceluloses a partir de tecidos jovens de *Araucaria angustifolia* e determinar suas composições monossacarídicas.
- Extrair sequencialmente hemiceluloses do xilema de *Araucaria angustifolia* e *Podocarpus lambertii* e determinar suas composições monossacarídicas.
- Purificar as frações principais de parede primária e secundária, utilizando métodos químicos e cromatográficos.
- Caracterizar estruturalmente as frações principais da parede primária e secundária.
- Analisar comparativamente os resultados obtidos de *Araucaria angustifolia* com os observados em *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus selowii*.
- Analisar e discutir as alterações na composição e estrutura dos componentes da parede primária durante o desenvolvimento celular, a partir das análises de polissacarídeos e oligossacarídeos das plântulas e ensaios preliminares com células cultivadas de *Araucaria angustifolia*.

## **3. Material e Métodos**

---

### **3.1. Obtenção do material de parede primária**

#### **a) Plantio convencional**

##### **- Germinação das sementes de *A. angustifolia***

Lotes de sementes de *Araucaria angustifolia* foram obtidos junto à empresa Agropastoril Novo Horizonte, município de Coronel Domingues Soares/PR. Cerca de 600 sementes selecionadas (maiores de 5 cm) foram submetidas à desinfecção por imersão em fungicida BENLATE 0,5% (m/v) por 2 horas.

Após a esterilização, as sementes foram estocadas em saco plástico fechado e escuro, de onde permaneceram até o início da germinação (aproximadamente 20 dias). As sementes germinadas foram transplantadas para recipientes plásticos individuais, contendo terra preta (sem adubo) como substrato e mantidas a temperaturas entre 18-23°C, sob sombreamento, durante aproximadamente 60 dias.

#### **b) Cultivo de células**

Células de *Araucaria angustifolia* foram inicialmente induzidas a embriogênese somática. A massa total de calos, cultivada durante 25 meses, foi então transferida para suspensão contendo meio de cultura BM (GUPTA e PULMANN, 1991). Duas suspensões foram realizadas, na ausência e presença de meio suplementado com reguladores de crescimento ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ), cinetina (Kin) (9,3  $\mu\text{mol/L}$ ) e benzilaminopurina (BAP) (12

$\mu\text{mol/L}$ ) (ASTARITA e GUERRA, 1999; ASTARITA e GUERRA, 2000). A cultura de células em suspensão foi mantida sob agitação (1 rpm), a 25°C, durante 30 dias, em ambiente escuro.

Alíquotas da suspensão (1 mL) foram retiradas a cada dois dias, iniciando-se no primeiro dia de suspensão até o trigésimo dia, sendo cada alíquota acondicionada em tubo fechado e imediatamente congelada. Seguiu-se diálise contra água destilada durante três dias, secagem em um speedvac (SAVANT SPEEDVAC PLUS SC 210A). O material seco foi então submetido a hidrólise de Saeman (descrito no item 3.7.).

Todos os experimentos envolvendo o cultivo de células de *A. angustifolia* foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **3.2. Obtenção do material de parede secundária**

- *Araucaria angustifolia* - Uma árvore de dez anos de idade e aspectos morfológicos adequados para a espécie foi obtida a partir de reflorestamento da empresa Agropastoril Novo Horizonte, município de Coronel Domingues Soares/PR. Uma seção de 50 cm de altura, a partir da base, foi utilizada como fonte de material de parede secundária.

- *Podocarpus* - Uma árvore de *Podocarpus lambertii* de oito anos de idade e aspectos morfológicos adequados para a espécie foi abatida junto a área

localizada no município de Bocaiúva do Sul, região metropolitana de Curitiba, local onde são encontrados maciços de pinheiro-bravo.

Uma árvore de *Podocarpus selowii* com cerca de cinco anos de idade foi obtida na região da Serra do Mar. Ambas as espécies de *Podocarpus* foram identificadas pelo Engenheiro Florestal Carlos Velozzo Roderjan.

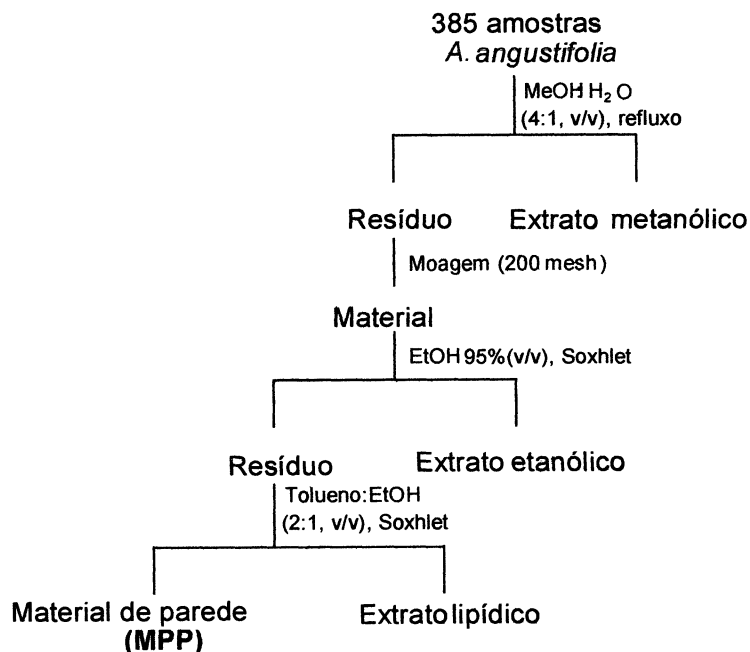
Para as três espécies, seções inferiores do tronco (0-50 cm a partir da base) foram selecionadas como fonte de parede secundária.

A seção de madeira de cada espécie foi previamente seca e moída em moinho WILLEY a 200 mesh, sendo em seguida submetida a deslipidificação com tolueno:EtOH (2:1, v/v), em aparelho Soxhlet por 48 horas. Os solventes foram posteriormente evaporados em capela.

### **3.3. Obtenção de polissacarídeos de parede primária**

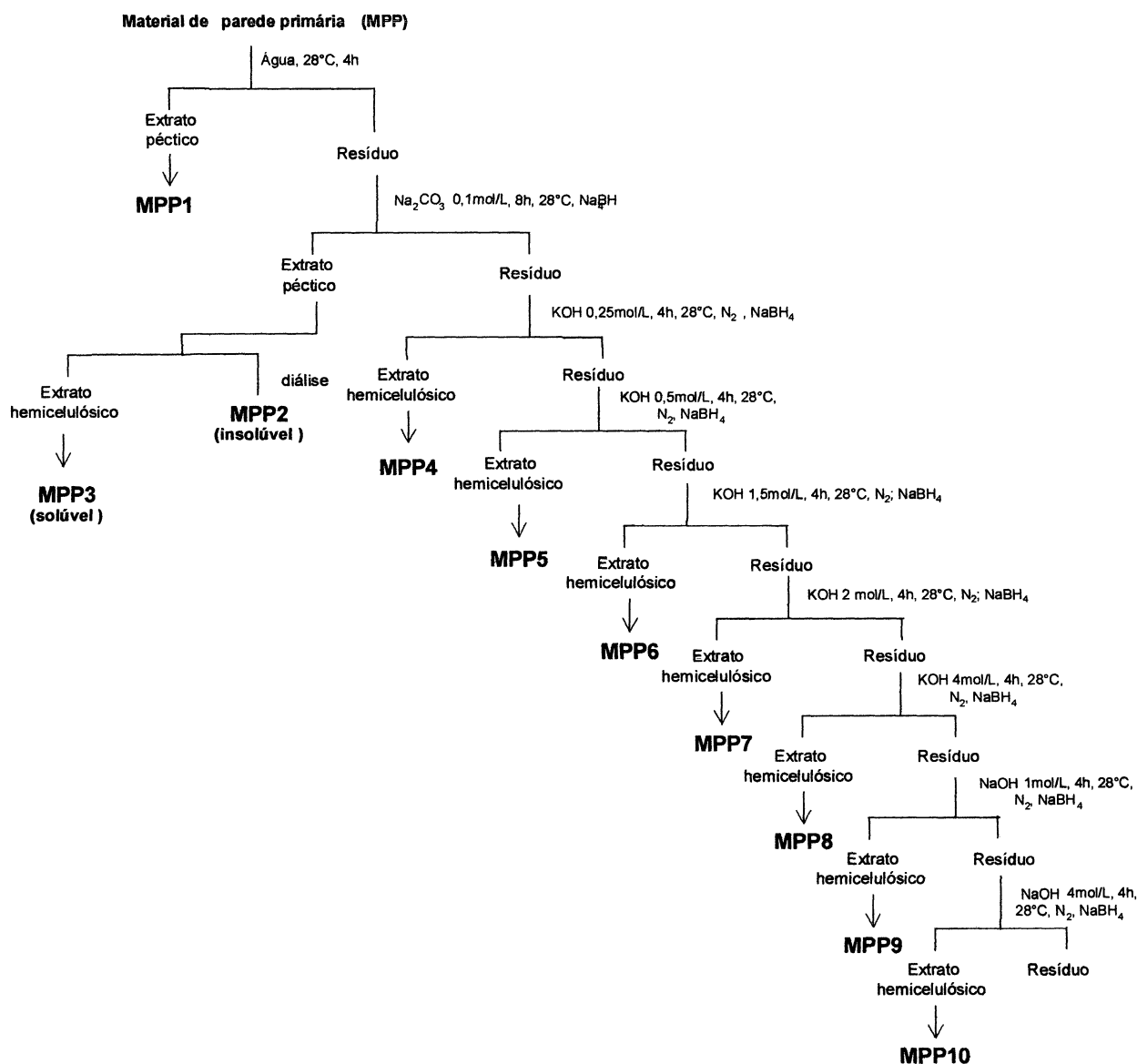
Foram selecionadas 385 mudas (escolhidas pelo aspecto geral e regularidade do caule), as quais foram submetidas a remoção de suas folhas e raízes. Cada caule foi segmentado em porções superior (**S**; 0-1 cm a partir do topo), médio (**M**; 1-5 cm) e inferior (**I**; 5-15 cm). Rapidamente, os caules segmentados foram cortados em pedaços menores e imediatamente submetidos a inativação enzimática com MeOH:H<sub>2</sub>O (4:1, v/v), sob refluxo, durante 5 minutos (Fluxograma I). Este tratamento também favorece a extração de oligossacarídeos provenientes de seiva. Os materiais foram secos, moídos em moinho WILEY e em seguida submetidos a despigmentação com EtOH, em Soxhlet, durante 72 horas. Posteriormente, procedeu-se a deslipidificação com tolueno:EtOH (2:1, v/v), em Soxhlet durante 48 horas. Os solventes foram evaporados em capela.

Os materiais secos renderam 3,30 g para a porção superior (S), 8,25 g para a porção média (M) e 15,51 g para a porção inferior dos caules (I)



**Fluxograma I.** Obtenção de material de parede primária (MPP), a partir de plântulas de *A. angustifolia*.

Os materiais de parede primária (S, M e I) foram submetidos simultaneamente a etapas sequenciais de extrações, conforme apresentado no Fluxograma II:



**Fluxograma II.** Obtenção de polissacarídeos do material de parede primária (MPP), a partir de plântulas de *A. angustifolia*.

As soluções hemicelulósicas alcalinas foram neutralizadas com ácido acético a pH 5, dialisadas contra água corrente para eliminação do sal (48 horas), seguidas de redução do volume para cerca de 10 mL. Aproximadamente quatro volumes de etanol foram utilizados para precipitar os polissacarídeos. O conteúdo



foi centrifugado, lavado novamente com excesso de EtOH, centrifugado e seco em estufa à vácuo.

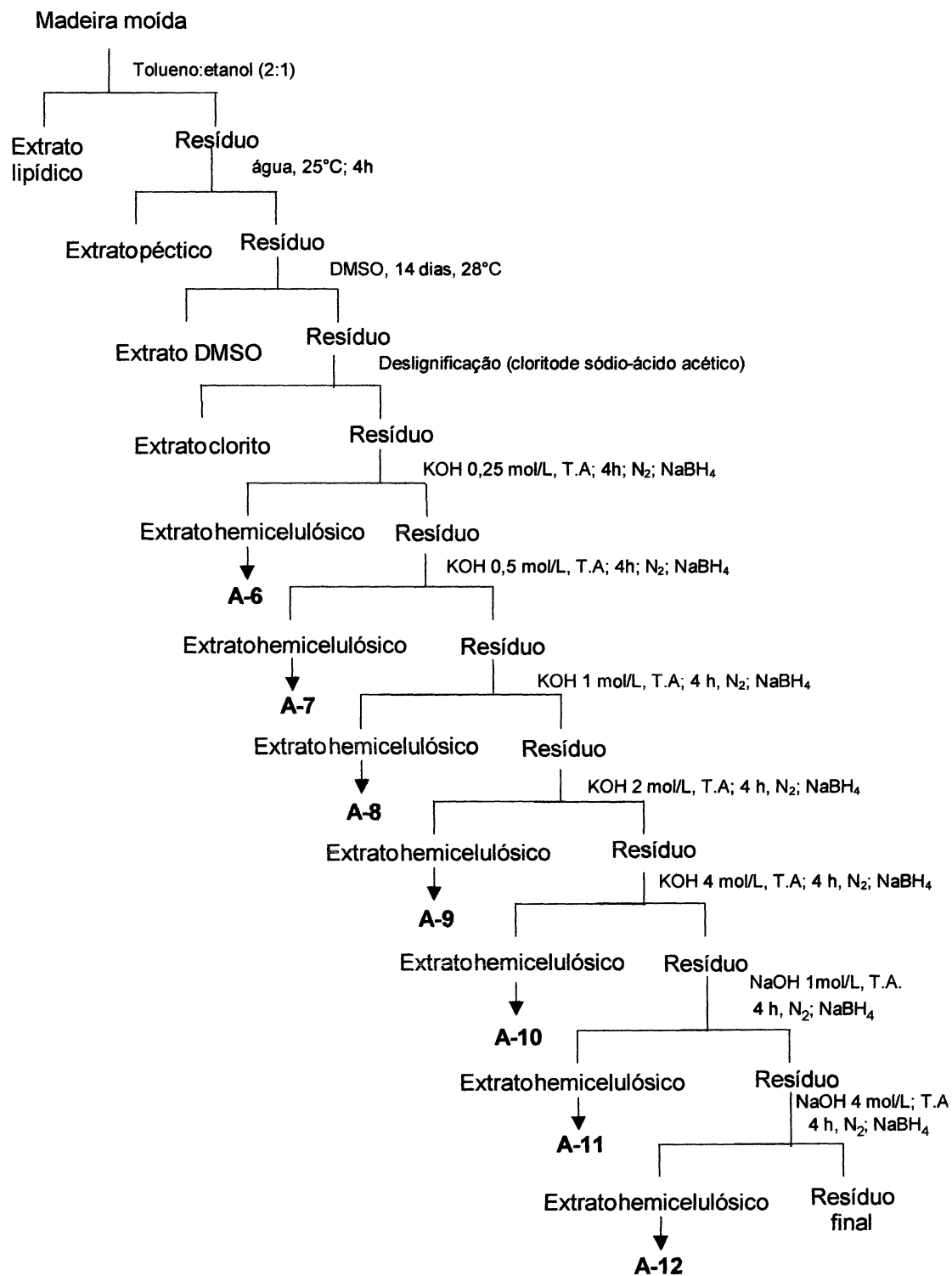
### **3.4. Obtenção de polissacarídeos de parede secundária**

As amostras de madeira de *A. angustifolia* e *P. lambertii*, livres de extrativos lipídicos e pigmentos, foram inicialmente extraídas com água (extrato péctico), seguindo-se por DMSO (extrato DMSO). Os resíduos da extração com DMSO foram submetidos ao processo de deslignificação modificada do método descrito por TIMELL (1965), desenvolvida durante a tese de Mestrado do mesmo autor (BOCHICCHIO, 1999). As proporções de reagentes utilizadas na deslignificação foram calculadas em relação a 30 g de material. Desta maneira, o material moído, juntamente com 490 mL de água destilada foi adicionado em um kitasato, sob aquecimento (65°C). Adicionou-se ao sistema 3,5 mL de ácido acético glacial e 24,5 mL de clorito de sódio 40% m/v, aplicando-se vácuo imediatamente.

Ao término desta extração, os resíduos provenientes do processo de deslignificação, obtidos das duas espécies, contendo celulose e hemicelulose (holocelulose), foram filtrados e lavados com etanol 95% fervente.

As holoceluloses resultantes de *A. angustifolia* e *P. lambertii*, bem como o material não tratado de *P. selowii*, foram submetidas a protocolos de extrações específicos:

*Araucaria angustifolia* - Tratamentos alcalinos com KOH (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mol/L) e NaOH (1 e 4 mol/L), conforme apresentado no Fluxograma III.



**Fluxograma III.** Extrações sequenciais de material de parede secundária, em xilema de *A. angustifolia*.

*Podocarpus lambertii* – Extração inicial com KOH 1 mol/L, resultando na fração KOH1a, conforme obtido em trabalho desenvolvido pelo autor durante a tese de Mestrado (BOCHICCHIO, 1999).

*Podocarpus selowii* - Cerca de 30 g de material foram diretamente submetidos à extração aquosa e DMSO, seguido por uma extração alcalina com KOH 1 mol/L, resultando na fração PS.

### **3.5. Monitoramento de formação da parede celular em plântulas de *A. angustifolia***

#### **a. Microscopia óptica**

Foram selecionados 12 caules de mudas, com idade aproximada de 80 dias e retiradas todas as folhas e raízes. Cortes transversais de aproximadamente 0,5 cm foram realizados nas porções superior (a partir do topo), média (1cm a partir do topo) e inferior (5 cm a partir do topo). Os segmentos de caule foram mantidos em EtOH 70% v/v e então submetidos à completa desidratação (EtOH absoluto) e fixados de acordo com o método de Karnovski (KARNOVSKI, 1965), utilizando infiltração e polimerização (KIT JB4) e por fim inseridos em historesina (FEDER e O'BRIEN, 1968). Os blocos resultantes foram cuidadosamente laminados em seções transversais de 7 $\mu$ m, em micrótomo OLYMPUS CUT 4055 e então transferidos para lâminas de vidro. As lâminas coradas com azul de toluidina (SAKAI, 1973), (Fluxograma IV) foram fotografadas em aumentos de 10, 40 e 100 vezes.

### Cortes transversais

#### Fixação (método Karnovski)

- paraformaldeído 4%
- glutaraldeído 2%
- tampão fosfato de sódio mono e dibásico 0,1mol/L
- armazenamento álcool 70%

### Material fixado

#### Inclusão em historesina

- desidratação (álcool 100%)
- parainfiltração (resina líquida)
- infiltração (resina líquida e ativador em pó; Kit JB4)
- polimerização (Kit JB4)

### Blocos

- Cortes em micrótomo 7 $\mu$ m
- corante azul de Toluidina

### Lâminas de *A. angustifolia*

**Fluxograma IV.** Preparo de lâminas de *Araucaria angustifolia*, para microscopia óptica.

Todas as análises referentes a microscopia óptica foram realizadas no Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

#### **b. Composição monossacarídica**

Seções de cinco plantas a diferentes alturas (a partir topo: 0-1 cm, 1-3 cm, 3-5 cm, 5-7 cm e 7-15 cm) foram obtidas. A seguir foram removidas suas folhas e raízes e após o processo de inativação enzimática e despigmentação, os segmentos foram secos, macerados e submetidos a hidrólise de Saeman (descrito

no item 3.7). Em seguida os produtos foram derivatizados a seus acetatos de alditóis e então analisados por cromatografia gasosa (item 3.7.).

### **3.6. Análises colorimétricas**

*Açúcar total* – Determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), usando xilose como padrão, com leitura a 480 nm (pentoses) ou glucose como padrão, com leitura a 490 nm (hexoses).

*Proteínas + compostos fenólicos* – O conteúdo de proteínas e compostos fenólicos foram determinados pelo método descrito por HARTREE (1972). Para amostras de parede secundária foi utilizado ácido coniferílico como padrão para fenólicos e em amostras de parede primária, soroalbumina bovina como padrão para proteínas.

*Proteínas* – A dosagem exclusiva de proteínas, em amostras de parede primária, foi realizada pelo método descrito por Peterson (PETERSON, 1977), o qual foi utilizado apenas para etapa de precipitação de proteínas. A etapa colorimétrica foi substituída pela metodologia de Hartree. As leituras foram realizadas em comprimento de onda a 650 nm. Soroalbumina bovina foi utilizada como padrão.

*Ácidos urônicos* – Determinados pelo método m-hidroxibifenil (BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN, 1973), usando ácido glucurônico como padrão e leitura a 520 nm.

### **3.7. Determinação da composição monossacarídica**

Cerca de 5 mg de cada fração polissacarídica foi utilizada para a hidrólise ácida com TFA 1 mol/L, em tubos hermeticamente fechados, durante 5 horas em banho de água fervente (ADAMS, 1965b). A solução de TFA foi evaporada em capela.

Amostras de material bruto, bem como resíduos finais de extrações foram submetidas à hidrólise de Saeman (SAEMAN et al., 1954). Aproximadamente 5 mg de amostra foram submetidas a um pré-tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (m/m), em tubos hermeticamente fechados, durante 1 hora em banho de gelo. Em seguida, a solução foi diluída para 8% (m/m) e mantida durante 5 horas em banho fervente, quando Ba(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> foi adicionado ao sistema até atingir pH 5. O sal insolúvel formado foi filtrado à vácuo.

Os monossacarídeos livres obtidos dos diferentes processos de hidrólise foram reduzidos pela adição de boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) a pH 10 (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Após duas horas foi adicionada resina catiônica DOWEX 50W-X 8-H<sup>+</sup> para remoção dos íons Na<sup>+</sup> (até pH 5,0). As soluções foram filtradas e o solvente evaporado a vácuo. Metanol foi adicionado ao resíduo e o borato de trimetila formado foi evaporado a vácuo.

Os alditóis foram acetilados pela adição de 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina, em tubos vedados, permanecendo durante cerca de 10 horas à temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). A reação foi interrompida adicionando-se água gelada e seguir procedida a extração dos acetatos de alditóis, através da adição de clorofórmio e posterior eliminação de

piridina em tratamentos sucessivos com sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) 5% (m/v) e água destilada. Os acetatos de alditóis formados foram submetidos à cromatografia líquido-gasosa (GLC) para análise da composição monossacarídica, em um comatógrafo HP 5890 II, coluna capilar DB-225, com detector por ionização de chama (FID) e temperaturas de 250 e 300°C para o injetor e detector, respectivamente. Nitrogênio foi usado como gás de arraste a 2 mL/min. A quantificação dos picos foi obtida por integrador HP acoplado ao cromatógrafo.

### **3.8. Análise de homogeneidade e determinação de massa molecular**

Amostras foram analisadas em HPLC acoplado a espalhamento de luz (HPSEC-MALLS), utilizando bomba WATERS 510 HPLC alimentando quatro colunas em série, com limites de exclusão de  $1 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$ . Detectores por índice de refração (RI) e espalhamento de luz (LS) foram utilizados para as amostras de polissacarídeos. O solvente usado foi nitrito de sódio 0,1 mol/L e azida de sódio 200 ppm dissolvidos em água milliQ. As amostras previamente filtradas em membranas MILLIPORE 0,2 $\mu\text{m}$  foram injetadas em "loop" de 250  $\mu\text{L}$ , a uma concentração de 2 mg/mL e fluxo de 0,6 mL/min, para determinação de homogeneidade. Determinação de  $dn/dc$  foi realizada por índice de refração, nas concentrações 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mg/mL, com fluxo de 0,1 mL/min. Todos os experimentos de HPSEC-MALLS foram conduzidos pelo software ASTRA 4.5.

### 3.9. Purificação das frações polissacarídicas

*Plântulas* – Cerca de 200 mg das frações MPP1-I, MPP5-I, MPP6-I, MPP7-I, MPP8-I e MPP10-I foram submetidos a cromatografia de troca iônica contendo gel DEAE-Trysacryl Plus Cl<sup>-</sup>, em uma coluna de 1,5 x 36,0 cm, com fluxo de aproximadamente 0,8 mL/min. As frações foram eluídas com água e monitoradas por fenol-ácido sulfúrico. Os produtos eluídos foram concentrados e precipitados com EtOH 3 V. Os polissacarídeos da fração MPP1-I e MPP7-I, retidos na coluna, foram eluídos com NaCl 0,2 mol/L, submetidos a diálise, concentrados e precipitados com EtOH 3 V, rendendo as frações MPP1-I[0,2M] e MPP7-I[0,2M], respectivamente. A fração MPP1-I foi ainda eluída com NaCl 2 mol/L, resultando na fração MPP1-I[2M].

*Xilema* – Uma solução de Ba(OH)<sub>2</sub> 1 mol/L foi preparada. O excesso de solução saturada foi filtrada em algodão e lentamente adicionada a uma solução aquosa da fração KOH1a (50 mg) (contendo 10 mg NaBH<sub>4</sub>) de xilema de *P. lambertii* (item 3.4; pág 34), a uma concentração de 1 mg/mL. O sistema, sob agitação constante, permaneceu durante 30 minutos, à temperatura ambiente. O material precipitado, separado por centrifugação, foi descartado e o sobrenadante foi dialisado durante dois dias, concentrado e precipitado com EtOH 3 V. O polissacarídeo em suspensão foi centrifugado e seco em estufa à vácuo.

Outro procedimento de purificação foi realizado utilizando CETAVLON (SCOTT, 1965). Uma solução do sal quaternário (500 mg) a uma concentração final de 3 mg/mL, foi adicionada a uma solução polissacarídica da fração KOH1a (150 mg), a uma concentração final de 10 mg/mL. À solução foi adicionado



Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a uma concentração final de 0,015 mol/L. O polissacarídeo precipitado foi separado por centrifugação e dialisado durante 3 dias contra água corrente. A solução foi finalmente concentrada, precipitada com EtOH 3 V e seca em estufa à vácuo.

### **3.10. Análises de metilação**

#### **a) Método de Haworth**

Foram utilizados cerca de 60 mg da fração A-12 (GGM) para o procedimento de pré-metilação, utilizando método de Haworth (HAWORTH, 1915; HIRST e PERCIVAL, 1960). A amostra foi solubilizada em 10 mL de solução NaOH 40% m/v. Ao sistema foi adicionado cerca de 5 mg de NaBH<sub>4</sub>. A seguir foram acrescentados sucessivamente ao sistema, sob constante agitação em banho de gelo, alíquotas de 0,5 mL de dimetil sulfato em intervalos de 30 minutos, por sete repetições. A reação permaneceu durante 12 horas, quando o meio foi neutralizado com ácido acético, em gelo, sendo posteriormente dialisado contra água corrente por 72 horas e posteriormente seco a vácuo.

#### **b) Método de Ciucanu**

O material parcialmente metilado da fração A-12, assim como todas as outras frações submetidas a metilação, foram submetidas ao tratamento pelo método descrito por CIUCANU e KEREK (1984). Adicionou-se à amostra seca 1

mL de DMSO e após solubilização, cerca de 40 mg de NaOH seco e pulverizado. Após 10 minutos de constante agitação em vórtex, adicionou-se ao meio 0,5 mL de iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ), permanecendo em agitação por 10 minutos, seguido pela acidificação com adição de gelo e gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (para polissacarídeos ácidos) ou AcOH (polissacarídeos neutros). Os produtos metilados foram extraídos do meio com clorofórmio e submetidos a sucessivas lavagens com água destilada. A detecção de bandas referentes a grupamentos hidroxila e metil nas amostras secas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho, acopladas a transformada de Fourier (FTIR), em um espectrofotômetro BOMEM HARTMAN (MB-series), utilizando discos de KBr finamente moídos juntamente com as amostras (2 mg). As análises compreenderam a faixa entre 400 a 3000 nm.

Os polissacarídeos parcialmente metilados foram submetidos a metanólise utilizando 2 mL de metanol saturado com HCl gasoso, durante 2 horas a  $65^\circ\text{C}$ . A reação foi interrompida pela adição de nitrato de prata ( $\text{Ag}_2\text{NO}_3$ ) até atingir a neutralidade. O sal insolúvel formado (cloreto de prata) foi separado por filtração. A solução filtrada contendo o material metanolisado foi submetida a hidrólise ácida com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 mol/L durante 6 horas em banho fervente. A solução foi neutralizada com carbonato de bário  $\text{BaCO}_3$  e filtrada.

Os monossacarídeos parcialmente metilados foram analisados em dois cromatógrafos a gás: a) VARIAN 3300, acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN MAT (GC-MS), utilizando coluna capilar DB-225 e DB-210 e hélio ultrapuro como gás de arraste, com fluxo de 2 mL/min, temperatura do detector a  $220^\circ\text{C}$  e integração dos picos obtida pelo software ITDS 4.10. e b) cromatógrafo VARIAN SATURN 2000R, utilizando as mesmas colunas condições de

temperatura, acoplado a um espectrômetro de massa VARIAN SATURN; integração realizada a partir do software GC/MS Workstation 5.41.

### **3.11. Carboxi-redução**

O processo de carboxi-redução foi realizado segundo TAYLOR e CONRAD (1972). Cerca de 10 mg da fração MPP1-I[0,2M] foram dissolvidos em 10 mL de tampão MES (2-[N-morpholine]-ethanosulfonic acid) (0,2 mol/L, pH 4,75), seguido pela adição 5 mg de carbodiimida (CMC). A mistura permaneceu sob agitação por aproximadamente 2 horas, quando foi adicionado ao sistema tampão TRIS (2 mol/L, pH 7,0) até estabilização em pH 7,0. Posteriormente, adicionou-se 1,1 g de NaBH<sub>4</sub> para uma concentração final de 2 mol/L. A redução foi mantida sob agitação, durante 12 horas, quando foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5,0. O material foi dialisado durante 72 horas, concentrado e liofilizado, rendendo 3,5 mg de material carboxi-reduzido.

### **3.12. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono treze (<sup>13</sup>C-RMN) foram obtidos em aparelho BRUKER AC-400, a 101,6 MHz, acoplado a transformador de Fourier. As análises foram realizadas em amostras solubilizadas em água deuterada (D<sub>2</sub>O) ou hidróxido de sódio deuterado (NaOD 1%), em tubos de 5 mm de diâmetro e temperatura de análise a 50°C. As concentrações das soluções polissacarídicas variaram de 20 a 40 mg/mL. Os deslocamentos

químicos são expressos em ppm. As amostras analisadas foram submetidas a técnicas monodimensionais de carbono treze ( $^{13}\text{C}$ -RMN) e próton ( $^1\text{H}$ -RMN), assim como técnicas bidimensionais (HMQC), de acordo com os requisitos apresentados pela amostra.

### **3.13. Oligossacarídeos de xiloglucanas obtidos por hidrólise enzimática**

Duas frações de xiloglucana obtidas a partir de extração alcalina com KOH 1,5 mol/L, relativas às porções superior (fração MPP6-S[H<sub>2</sub>O]) e inferior (MPP6-I[H<sub>2</sub>O]) dos caules de *A. angustifolia* foram submetidas à hidrólise enzimática para produção de oligossacarídeos. Uma solução de 0,5% (m/v) de xiloglucana, em tampão acetato de sódio (50 mmol/L pH 5,0) foram incubadas com 200  $\mu\text{L}$  de uma celulase de *Trichoderma viride* (Megazyme, 500 U/mL), durante 24 horas a 30°C. As soluções de oligossacarídeos produzidos foram analisados em um HPLC, com detecção por pulso amperométrico (“HPAEC-PAD; high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection”), com uma coluna Carbpak PA-100 (Dionex). A separação foi realizada em 88 mmol/L NaOH, com um gradiente linear de acetato de sódio de 35 a 75 mmol/L por 20 minutos seguido por outro gradiente linear de 75 a 200 mmol/L, durante 50 minutos (0,9 mL/min). Estes experimentos foram realizados na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo.

### **3.14. Fragmentação de massa por Electrospray-MS (ESI-MS)**

A amostra de oligossacarídeos produzida a partir da fração MPP6-I[H<sub>2</sub>O] foi submetida a uma fragmentação de massa, utilizando um Electrospray-MS em um sistema Finningan MAT – espectrômetro de massa quadrupolo. A amostra liofilizada contendo 1 mg de oligossacarídeos foi dissolvida em 100 µL de água e a temperatura do capilar de 225°C, com fluxo de 10 µL/min. A análise abrangeu um intervalo entre m/z 300 e 2500 m/z. As análises foram realizadas no Departamento de Farmácia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

## **4. Resultados e Discussão**

---

#### 4.1. Polissacarídeos das plântulas de *A. angustifolia*

Os polissacarídeos de parede primária podem ser obtidos a partir de tecidos obtidos por plantio convencional (ACEBES, MORAL e ZARRA, 1993; ANDREW e LITTLE, 1997; KAKEGAWA et al., 1998; FEMENIA et al., 1999a e b; VIERHUIS, et al., 2000; OBEL, PORCHIA e SCHELLER, 2002) ou células em cultura de tecidos (WHITCOMBE et al., 1995; MARUYAMA et al., 1996; TAKEUCHI et al., 1996; MOLLARD et al., 1997; YEO et al., 1998; THOMPSON e FRY, 2000; GÜNTER e OVODOV, 2002).

A escolha de umas dessas técnicas deve considerar os objetivos, vantagens e desvantagens apresentadas para cada uma das metodologias. Neste aspecto, uma grande virtude do cultivo de células é a possibilidade de se obter material de parede primária em grandes quantidades. Entretanto, a ausência de pressões ambientais, como as de tensão e compressão (JARVIS e McCANN, 2000), são fatores limitantes no emprego desta técnica no estudo da arquitetura da parede celular, uma vez que não representam com fidelidade o estado nativo de uma célula vegetal. É importante considerar que os mais conceituados trabalhos envolvendo arquitetura da parede celular foram realizados a partir de cultura de células, como os modelos descritos por KEEGSTRA et al. (1973) e CARPITA e GIBEAUT (1993).

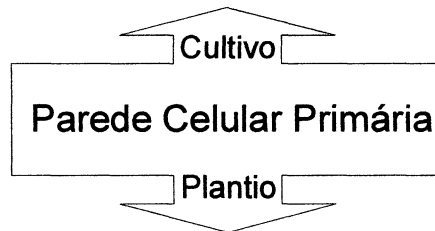
Recentes experimentos que avaliaram o crescimento de plântulas de *Arabidopsis* sob ambiente de microgravidade resultaram em um aumento significativo do alongamento vegetal (SOGA et al., 2001), o que foi diretamente proporcional a elevação da síntese de xiloglucana, uma vez que este

polissacarídeo está diretamente envolvido no processo de expansão e alongamento celulares. Por outro lado, trabalhos anteriores mostraram que exposições a macrogravidade inibem a via biossintética dos mesmos (BRETT e WALDRON, 1990). Estas condições ambientais extremas para o crescimento de um vegetal sugerem que a produção e disposição dos elementos da parede de uma célula podem ser intensamente modificadas pela maneira como se obtém o tecido, apresentando-se muito diferente de seu perfil nativo.

O fornecimento de material de parede primária via plantio convencional parece ser a única maneira encontrada para solucionar esta questão. Entretanto, efeitos negativos também são observados no emprego desta técnica. Para obter polissacarídeos purificados, diversas etapas de tratamentos químicos, principalmente a deslignificação, são consideradas nocivas à manutenção das estruturas nativas. Além disso, a contaminação por parede secundária é praticamente inevitável e o baixo rendimento obtido de parede primária requer o plantio de centenas de mudas. A Figura 13 mostra algumas vantagens e desvantagens que as técnicas de cultivo de células e plantio convencional podem proporcionar.



- Menor ocorrência de parede secundária
- Maior rendimento
- Extração facilitada de polissacarídeos
- Representativo da natureza?



- Maior ocorrência de parede secundária
- Menor rendimento
- Extração drástica de polissacarídeos
- Representativo da natureza!

**Figura 13.** Esquema das vantagens e desvantagens do emprego do plantio convencional e cultivo de células para obtenção de parede celular primária.

Modelos de parede celular primária de gimnospermas, assim como o conhecimento dos mecanismos de expansão e síntese de polímeros, são pobremente explorados. A escassez de trabalhos envolvendo este grupo vegetal motivou o estudo dos aspectos dinâmicos de formação da parede primária de *A. angustifolia*, uma gimnosperma de larga ocorrência na região sul do Brasil, conjugando amostragem por plantio convencional e ensaios preliminares de cultivo de células desta espécie.

#### **4.1.1. Monitoramento de formação da parede celular**

Inicialmente, as mudas de *Araucaria angustifolia* foram mantidas em ambiente propício ao seu desenvolvimento, utilizando-se terra como substrato e

temperaturas entre 18-23°C, além de sombreamento durante todo o dia, onde são alcançadas as maiores taxas fotossintéticas (INOUE e TORRES, 1980). As plântulas formadas serviram como fonte de material de parede primária (MPP), conforme descrito em Materiais e Métodos, item 3.3., com o objetivo de minimizar a presença de polissacarídeos de parede secundária, que compõem cerca de 90% da célula de xilema totalmente formada (SJÖSTRÖM, 1993).

A estratégia adotada para detectar a formação da parede secundária nos caules de *A. angustifolia* baseou-se no típico modelo de crescimento de um vegetal. Novas células, produzidas a partir dos meristemas concentram-se nas regiões externas do caule. À medida que são produzidas, as novas células passam a se localizar externamente àquelas anteriormente formadas, como uma série de cones sobrepostos uns sobre os outros. Deste modo, células novas concentram-se nas regiões apicais e células maduras nas porções basais do caule.

Assim, diversas plântulas foram submetidas a monitoramentos da formação de parede secundária, através de análises de composição monossacarídica (hidrólise de Saeman) e micrografias do caule, em diferentes alturas de uma plântula, cujas idades eram de aproximadamente 80 dias.

A formação de parede secundária foi acompanhada pelo aumento dos teores de manose (monossacarídeo controle), resultado da síntese crescente de glucomananas, conforme já discutido para o xilema *A. angustifolia*. A Tabela I mostra os teores de manose, bem como dos demais monossacarídeos de plantas, observadas em diferentes intervalos de altura (0-1cm, 1-3 cm, 3-5 cm, 5-7 cm e 7-15 cm, todos a partir do topo), após a hidrólise de Saeman.

Tabela I. Hidrólise de Saeman das seções de plântulas de *A. angustifolia*.

Seções (cm)	Composição monossacarídica (mol %)*					
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal
0-1	4.3	3.9	45.7	11.6	<b>6.2</b>	32.1
1-3	5.9	2.5	46.2	10.7	<b>7.8</b>	35.3
3-5	6.3	2.0	40.8	9.9	<b>8.9</b>	32.1
5-7	4.0	2.0	51.0	7.5	<b>13.3</b>	22.0
7-15	4.8	2.0	44.2	14.3	<b>14.9</b>	23.7

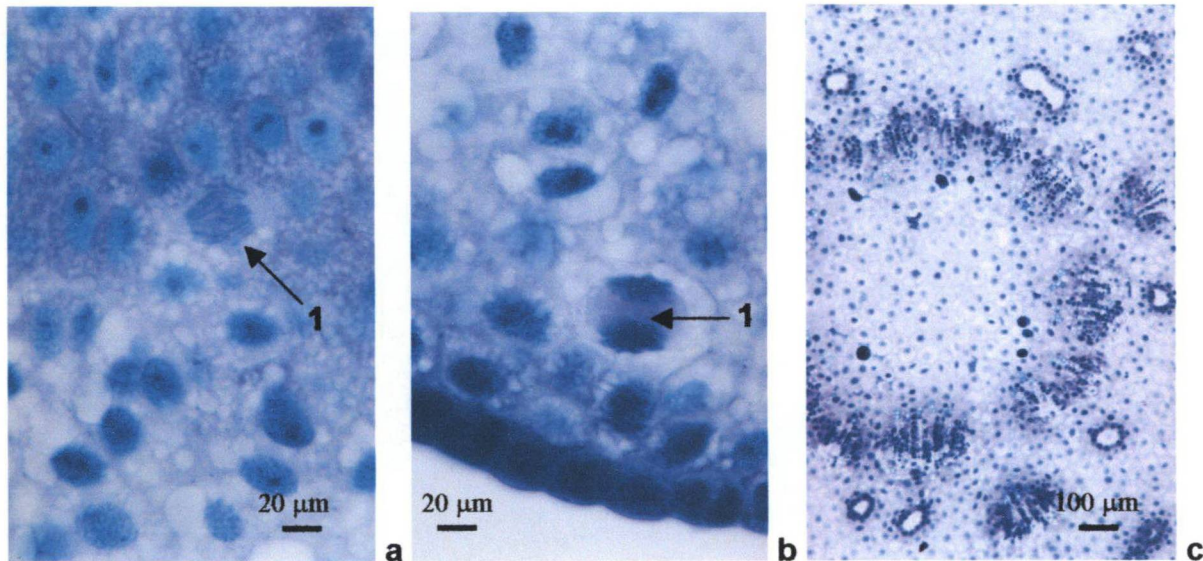
\* Glucose foi omitida.

Os resultados obtidos sugerem a formação crescente de polissacarídeos compostos por manose (galactoglucomanas), particularmente entre as alturas 5 a 7 cm, embora os teores sejam ainda muito inferiores àqueles correspondentes à formação completa de parede secundária, observada por exemplo, em *A. angustifolia* (36%) e em outras gimnospermas (~35-40%) (TIMELL, 1964; FENGEL e WEGENER, 1989). Desta maneira, analisando os resultados de hidrólise Saeman, foi sugerida a altura ideal de 5 cm dos caules de *A. angustifolia* para obtenção de material de parede primária em quantidade significativa.

A fim de tornar consistente as informações geradas pela composição monossacarídica, monitoramentos por microscopia óptica de caules a diferentes intervalos de altura também foram realizados. Cada caule foi analisado a partir de cortes transversais dos terços superior (topo), médio (1 cm) e inferior (5 cm) (Materiais e Métodos, item 3.5a).

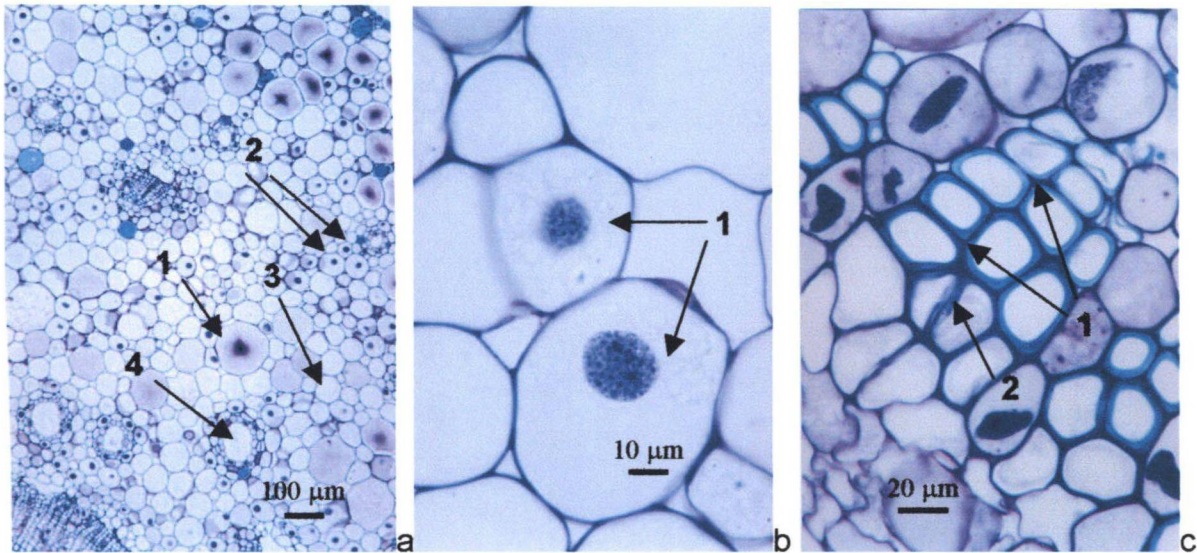
A porção superior do caule (Figura 14a) mostra, em detalhe, a fase inicial do processo de mitose em uma célula meristemática. Da mesma forma, a Figura 14b apresenta uma célula em fase final do processo de mitose, sem ainda

apresentar divisão celular completa. Os aspectos gerais desta porção do caule podem ser melhor visualizados na Figura 14c, onde todas as células apresentam seus núcleos preservados, indicativos de intensa atividade meristemática e, conseqüentemente, presença exclusiva de parede celular primária.



**Figura 14.** Corte transversal da porção superior do caule. **a)** Cromátides em organização; aumento 40X. **b)** Cromátides em fase mitótica final; células em diferenciação (1); aumento 40X. **c)** Aspectos gerais da porção superior do caule, apresentando todos os núcleos preservados; aumento 10X.

Cortes realizados a 1 cm do topo (porção média) (Figura 15a) apresentam menor quantidade de células preservadas, e inúmeras células com ausência de núcleo e tamanho nitidamente maior, com paredes ainda delgadas, indicativo de células em processo de expansão. Pode-se ainda observar a presença de células compartimentadas (Figura 15a e b), estrutura característica do gênero *Araucaria* (BAMBER e SUMMERVILLE, 1978) e de função fisiológica ainda desconhecida, além de canais resiníferos.



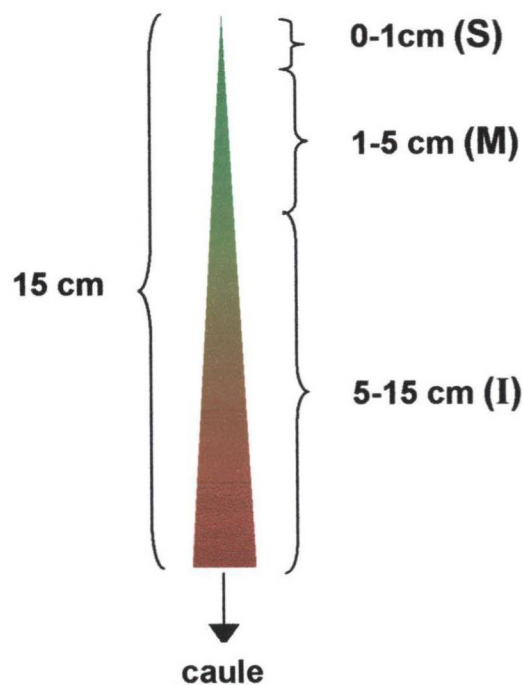
**Figura 15a.** a) Corte transversal da porção média do caule (40X), mostrando seus aspectos gerais, presença de células compartimentadas (1), algumas células com núcleo preservado (2); células maiores sem núcleo (3) e canais resiníferos (4). b) porção média do caule mostrando as células compartimentadas, em detalhe (1) c). Detalhe da porção inferior (100X), mostrando células com alto conteúdo celulósico (1); pontoação areolada (2).

É importante observar que a presença de parede primária pode ser confirmada pela coloração azul intensa, resultante da formação de complexo entre o corante azul de toluidina com os componentes ácidos da parede primária (pectinas), presentes em grandes quantidades.

Sabendo-se que a deposição de parede secundária ocorre somente quando cessa o fenômeno de expansão (COSGROVE, 2001), a Figura 15c mostra em detalhe, células espessas da porção inferior do caule com alto conteúdo de material celulósico, de coloração azul claro, indicativo de grande quantidade de material de parede secundária, o qual possui menor conteúdo de polímeros contendo ácidos urônicos do que a parede primária. Além disso, a ausência completa de células com núcleo preservado e a presença de pontoações areoladas (função de comunicação célula-célula), uma estrutura anatômica

tipicamente encontrada no xilema, confirmam a maturidade das células nesta porção do caule.

Considerando os experimentos de microscopia em conjunto com as composições monossacarídicas, evidências indicam que nas porções superiores do caule (1cm, a partir do topo) encontram-se células com grande atividade meristemática; Nas porções médias a maior parte das células já se encontra em fase de expansão (1-5 cm) e nas porções inferiores dos caules (5-15 cm) já ocorre intensa deposição de parede secundária. Desta maneira, cada uma das 385 amostras de *A. angustifolia* foi segmentada e reunidas em três porções, a partir do topo: superior (1cm; **S**), média (1-5cm; **M**) e inferior (5-15 cm; **I**), como mostrado na Figura 16.



**Figura 16.** Modelo ilustrativo das porções superior (S), média (M) e inferior (I) das amostras de caules das plântulas de *A. angustifolia*.

#### 4.1.2. Extração de polissacarídeos

As três porções obtidas foram separadas, submetidas seqüencialmente a inativação enzimática, moagem, secagem e despigmentação, resultando nos materiais de parede primária S (porção superior), M (porção média) e I (porção inferior).

As extrações de hemiceluloses foram realizadas simultaneamente para as três porções de material, conforme ilustrado no Fluxograma II (pág. 31), em Materiais e Métodos. Inicialmente, a extração aquosa dos materiais S, M e I (frações MPP1-S; MPP1-M e MPP1-I) resultaram na extração de grande quantidade de material péctico, confirmado pela presença de alto conteúdo de ácidos urônicos (Tabela II, III e IV). Entretanto, vários autores citam as soluções de CDTA e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  como extratores ideais de polissacarídeos pécticos (EDASHIGE e ISHII, 1997; McCANN et al., 1992). O primeiro atuando como quelante de pectatos de cálcio e o segundo extraindo principalmente RG-I (ZABBLACKIS et al., 1995). O tratamento direto com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  provavelmente permite a extração total tanto de homogalacturonanas como de ramnogalacturonanas.

Desta maneira, o resíduo obtido após a extração aquosa foi submetido ao tratamento com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 mol/L. Os extratos obtidos, submetidos à diálise, apresentaram intensa formação de gel, característico da presença de homogalacturonanas (ZABBLACKIS et al., 1995). Estes produtos resultaram nas frações MPP2-S, MPP2-M e MPP2-I, caracteristicamente insolúveis em água. Todas estas frações apresentaram teores elevados de ácidos urônicos (~45%). A

presença de ramnoglacturonanas também foi observada, principalmente na fração MPP2-S, devido ao teor de ramnose (19,2%), aproximadamente duas vezes maior que nas frações MPP2-M e MPP2-I.

O extrato solúvel após diálise, do tratamento com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> resultou nas frações MPP3-S, MPP3-M e MPP3-I, as quais apresentaram redução no conteúdo de ácidos urônicos, aumento nos níveis de arabinogalactanas e de xilanas, este último observado em maior quantidade na fração superior MPP3-S.

A extração seguinte com KOH 0,25 mol/L apresentou os primeiros indícios de solubilização de xiloglucanas, uma vez que foram observadas as presenças de fucose e glucose. As concentrações crescentes de álcali extraíram de maneira eficiente quantidade cada vez maior de xiloglucanas. Entretanto, em todas as frações, níveis elevados de pectinas foram encontrados, o que confirma o envolvimento dos polissacarídeos ácidos na complexa rede de polissacarídeos da parede celular. Interações entre xiloglucanas e pectinas foram investigadas recentemente em cultura de células de rosa (THOMPSON e FRY, 2000), entre xiloglucanas, xilanas e pectinas (FEMENIA et al., 1999a), além das interações entre as xiloglucanas com as microfibrilas de celulose (HAYASHI, 1989; CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Concentrações elevadas de álcali são relatadas na literatura para a extração de GGM de parede secundária (CAPEK et al., 2000). De fato, as porções inferiores do caule são constituídas em grande parte por parede secundária, como já demonstrado pelos ensaios preliminares de teores de manose (hidrólise de Saeman) e microscopia.



**Tabela II.** Composição de açúcares neutros, dosagem de ácidos urônicos, proteínas e fenólicos totais das amostras obtidas da porção SUPERIOR dos caules de *A. angustifolia*.

Fração	Rend. <sup>1</sup> (g%)	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácido urônico <sup>2</sup>	Prot+Fen <sup>3</sup>	Prot <sup>4</sup>
MPP1-S (água)	2,32	9,8	--	--	11,8	6,0	5,1	19,8	3,4	44,1	nd	nd
MPP2-S (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> insolúvel)	0,78	19,2	--	--	25,4	1,2	--	8,2	0,5	45,4	nd	nd
MPP3-S (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> solúvel)	2,87	8,5	--	6,1	34,0	12,4	2,9	12,3	0,9	22,9	17,3	17,8
MPP4-S (KOH 0,25 mol/L)	1,18	6,1	1,6	3,9	24,4	11,7	3,6	17,1	12,6	19,0	25,4	18,6
MPP5-S (KOH 0,5 mol/L)	4,44	9,8	1,4	1,6	13,5	9,5	2,5	12,3	31,6	17,8	37,0	31,2
MPP6-S (KOH 1,5 mol/L)	1,82	1,9	2,8	--	31,5	15,9	1,8	22,8	11,5	11,8	35,5	25,3
MPP7-S (KOH 2 mol/L)	0,99	1,8	1,7	--	30,5	8,8	3,2	14,8	8,7	30,5	20,1	19,6
MPP8-S (KOH 4 mol/L)	0,72	2,0	2,3	--	30,5	9,1	7,1	13,2	9,9	25,7	8,3	8,7
MPP9-S (NaOH 1 mol/L)	0,60	9,4	--	--	43,4	5,9	5,5	13,0	3,2	19,5	9,1	nd
MPP10-S (NaOH 4 mol/L)	0,38	1,3	--	--	58,7	7,4	5,8	14,3	2,1	10,3	5,1	nd

<sup>1</sup> Referente ao material despigmentado e seco

<sup>2</sup> Determinação pelo método m-hidroxibifenil (BLUMENKRANTZ e ASBOE HANSEN, 1973)

<sup>3</sup> Proteínas + fenólicos, determinação pelo método de Hartree (HARTREE, 1972)

<sup>4</sup> Proteínas, determinação pelo método de Peterson (PETERSON, 1977)

**Tabela III.** Composição de açúcares neutros, dosagem de ácidos urônicos, proteínas e fenólicos totais das amostras obtidas da porção MÉDIA dos caules de *A. angustifolia*.

Fração	Rend <sup>1</sup> (g%)	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Acido urônico <sup>2</sup>	Prot+Fen <sup>3</sup>	Prot <sup>4</sup>
MPP1-M (água)	1,66	6,0	--	--	10,2	2,9	7,0	18,8	7,2	47,8	nd	nd
MPP2-M (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> insolúvel)	1,77	9,5	--	--	32,6	2,1	--	10,4	0,5	44,9	nd	nd
MPP3-M (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> solúvel)	1,94	13,8	--	1,3	22,0	11,2	4,5	17,8	3,4	25,9	6,2	7,0
MPP4-M (KOH 0,25 mol/L)	2,04	6,9	1,0	1,7	27,6	9,2	2,7	14,1	10,9	26,0	33,3	32,4
MPP5-M (KOH 0,5 mol/L)	2,24	8,6	--	1,9	26,0	12,1	4,0	14,5	12,4	20,5	29,9	24,4
MPP6-M (KOH 1,5 mol/L)	5,70	2,0	2,7	--	20,0	19,8	6,2	15,1	18,1	16,1	35,5	29,6
MPP7-M (KOH 2 mol/L)	2,40	1,1	2,3	--	22,7	20,0	9,2	12,6	17,4	14,7	21,6	21,2
MPP8-M (KOH 4 mol/L)	2,26	0,9	1,5	--	29,9	15,9	14,2	9,6	8,4	19,6	18,5	18,0
MPP9-M (NaOH 1 mol/L)	1,11	2,6	--	--	43,9	5,9	8,2	10,4	2,3	26,6	9,2	nd
MPP10-M (NaOH 4 mol/L)	0,61	1,4	2,8	--	21,6	26,5	7,6	12,5	16,7	10,9	5,2	nd

<sup>1</sup> Referente ao material despigmentado e seco

<sup>2</sup> Determinação pelo método m-hidroxibifenil (BLUMENKRANTZ e ASBOE HANSEN, 1973)

<sup>3</sup> Proteínas + fenólicos, determinação pelo método de Hartree (HARTREE, 1972)

<sup>4</sup> Proteínas, determinação pelo método de Peterson (PETERSON, 1977)

Tabela IV. Composição de açúcares neutros, dosagem de ácidos urônicos, proteínas e fenólicos totais das amostras obtidas da porção INFERIOR dos caules de *A. angustifolia*.

Fração	Rend <sup>1</sup> (g%)	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácido urônico <sup>2</sup>	Prot+Fen <sup>3</sup>	Prot <sup>4</sup>
MPP1-I (água)	0,60	4,1	--	--	32,0	2,8	4,1	19,3	3,8	33,8	14,2	12,5
MPP2-I (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> insolúvel)	2,78	9,7	--	--	31,2	1,9	0,6	10,4	1,5	44,7	nd	nd
MPP3-I (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> solúvel)	1,13	13,9	--	2,0	26,7	8,4	4,6	14,7	2,9	26,8	25,6	24,1
MPP4-I (KOH 0,25 mol/L)	1,81	2,3	0,8	2,2	17,8	7,8	2,1	7,8	17,1	42,1	36,7	32,4
MPP5-I (KOH 0,5 mol/L)	2,89	4,2	0,9	2,5	26,3	10,4	2,9	10,1	24,2	18,5	42,6	33,9
MPP6-I (KOH 1,5 mol/L)	3,82	1,5	4,2	--	9,6	31,4	3,3	11,5	22,2	16,3	29,9	25,3
MPP7-I (KOH 2 mol/L)	2,94	1,4	3,6	--	11,2	25,9	8,8	12,0	20,6	16,5	29,3	27,5
MPP8-I (KOH 4 mol/L)	3,83	1,2	3,0	--	14,5	27,7	10,4	11,2	15,1	16,9	25,6	26,2
MPP9-I (NaOH 1 mol/L)	1,41	3,2	1,4	--	25,5	23,7	4,7	12,3	8,3	20,9	8,7	nd
MPP10-I (NaOH 4 mol/L)	1,12	0,5	0,5	--	7,3	8,9	50,4	6,3	17,6	8,5	4,9	nd

<sup>1</sup> Referente ao material despigmentado e seco

<sup>2</sup> Determinação pelo método m-hidroxibifenil (BLUMENKRANTZ e ASBOE HANSEN, 1973)

<sup>3</sup> Proteínas + fenólicos, determinação pelo método de Hartree (HARTREE, 1972)

<sup>4</sup> Proteínas, determinação pelo método de Peterson (PETERSON, 1977)

O tratamento final (NaOH 4 mol/L) da porção inferior dos caules apresentou grande quantidade de GGM (fração MPP10-I; Man:Glc:Gal 2,9:1:0,4).

Foi possível observar que o mesmo tratamento para a porção superior dos caules mostrou a existência de arabinanas (fração MPP10-S). Este material apresentou baixa solubilidade em água após secagem, o que pode indicar um baixo grau de ramificação da molécula.

Altos teores de ácidos urônicos, arabinose e galactose confirmam que as pectinas são encontradas em grandes quantidades para todas as frações, principalmente em MPP3-S.

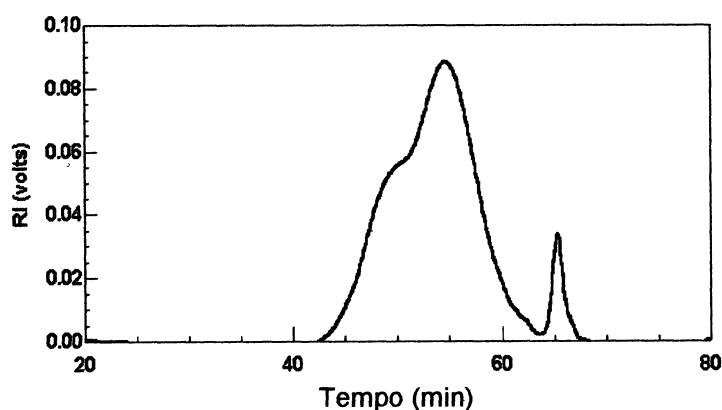
As frações brutas foram submetidas também a análises dos conteúdos de proteínas e compostos fenólicos. Considerando que a utilização do método descrito por HARTREE (1972) para dosagem de proteínas também responde para a detecção de compostos fenólicos, o método descrito por PETERSON (1977), que elimina a interferência de fenólicos, foi empregado neste trabalho. Foi verificado em todas as frações analisadas, que as dosagens pelo método de Peterson são iguais ou pouco superiores às dosagens pelo método de Hartree, caracterizando, desta maneira, a maior parte da detecção é referente à presença de proteínas.

### 4.1.3. Purificação e elucidação das principais estruturas

#### a) Análise da fração MPP1-I

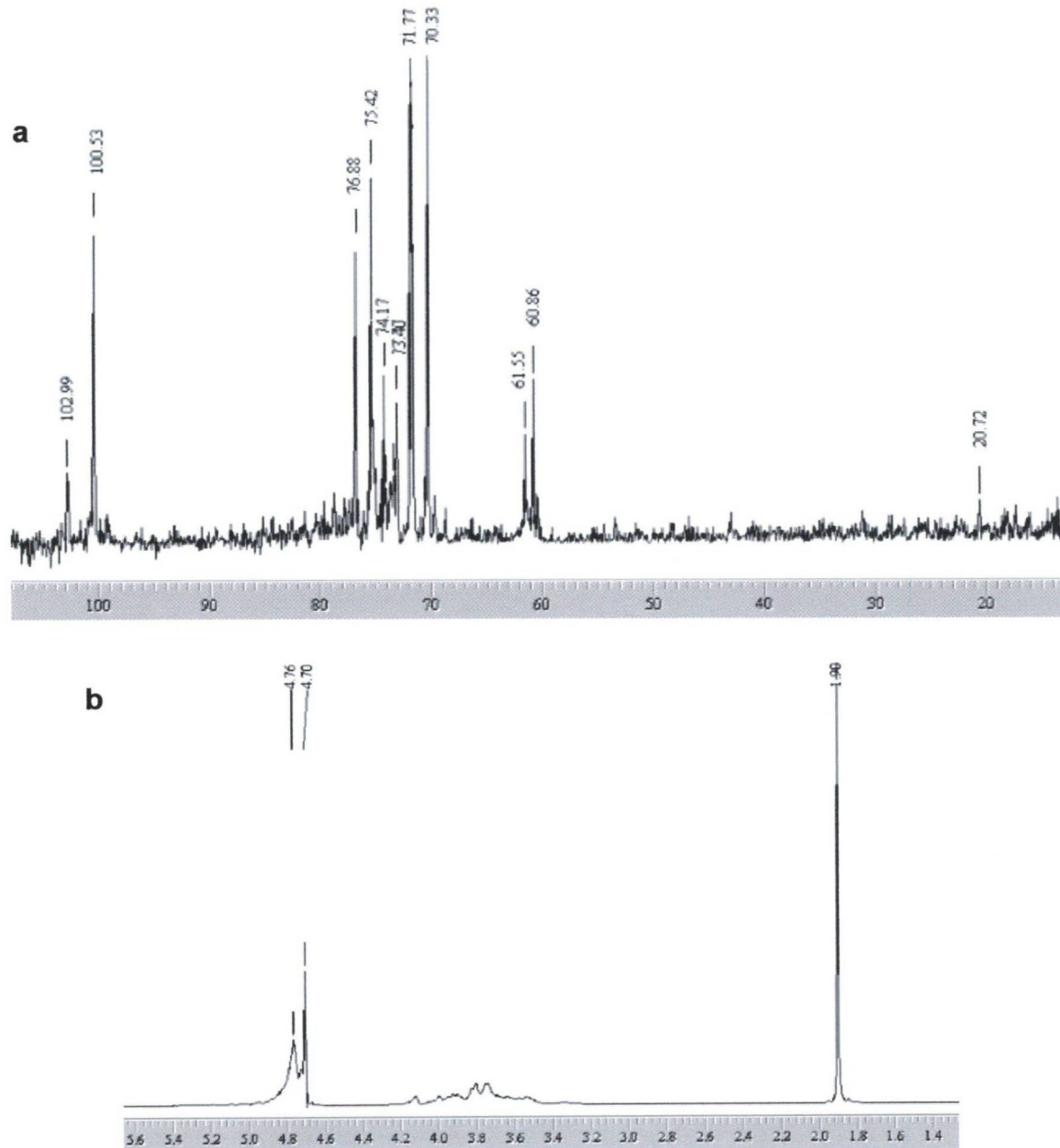
##### Eluição em água

A fração MPP1-I foi submetida a uma cromatografia de troca iônica utilizando-se gel DEAE-Trysacryl Cl<sup>-</sup>, com o objetivo de verificar a existência de polissacarídeos neutros. Assim, o material (200 mg) foi inicialmente eluído com água, resultando na subfração MPP1-I[H<sub>2</sub>O] (16 mg). Esta fração apresentou um perfil heterogêneo quando analisado por HPSEC (Figura 17), apesar de a composição monossacarídica mostrar a predominância de Man (59,1%), Glc (16,9%) e Gal (10,6%), indicativo da presença de GGM. Outros monossacarídeos também foram encontrados, como Ara (5,6%), Xyl (8,2) e Rha (0,5%).



**Figura 17.** Perfil de eluição (HPSEC) da fração obtida de plântulas de *A. angustifolia* por extração aquosa e fracionada por DEAE-Trysacryl (eluição aquosa) (fração MPP1-I[H<sub>2</sub>O]).

A análise desta fração por RMN (Figura 18) confirmou a existência de uma cadeia principal composta por unidades manose e glucose pela presença de doze sinais característicos, sendo a região anomérica representada pelos sinais em  $\delta$  102.99 ( $\beta$ -Glc $p$ ) e  $\delta$  100.53 ( $\beta$ -Man $p$ ) (Tabela V).



**Figura 18.** Espectro de RMN da fração MPP1-I[H<sub>2</sub>O], apresentando em a)  $^{13}\text{C}$ -RMN da região de 20 a 110 ppm e b)  $^1\text{H}$ -RMN da região de 1 a 5 ppm.

A alta solubilidade desta fração pode ser atribuída, em parte, pelos teores elevados de galactose substituindo a cadeia principal e, principalmente, à presença de grupamentos acetil, conforme identificado no espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$  20,73; Figura 18a) e  $^1\text{H}$  ( $\delta$  1,90; Figura 18b). Grupos O-acetil foram várias vezes relatados para moléculas de GGM de gimnospermas, quando extraídos em água (CROON e LINDBERG, 1958; TYMINSKI e TIMELL, 1960; SCHWARZ e TIMELL, 1963; SJÖSTROM, 1993).

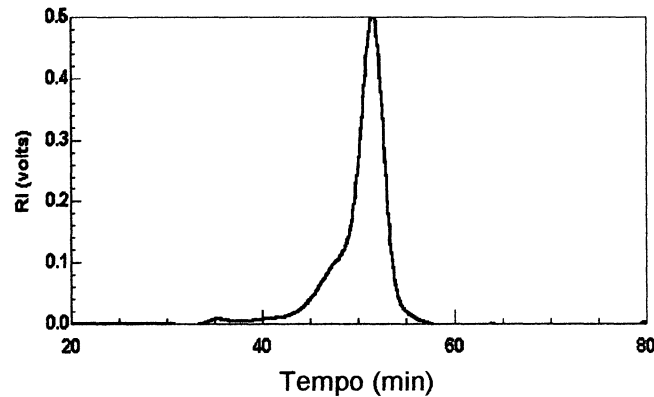
**Tabela V.** Sinais correspondentes aos carbonos da fração MPP1-I[ $\text{H}_2\text{O}$ ], a partir de análise por  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Ligação	Deslocamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\beta \rightarrow 4$ -Manp-(1-	100,53	70,33	71,77	76,88	75,42	61,56
$\beta \rightarrow 4$ -Glc p-(1-	102,99	73,41	75,40	78,87	73,42	60,86

#### Eluição em NaCl 0,2 mol/L

A fração MPP1-I retida na coluna de troca iônica DEAE-Trysacryl  $\text{Cl}^-$  foi eluída com concentrações crescentes de NaCl, onde foi verificado que 0,2 mol/L liberou grande quantidade de material, rendendo uma fração praticamente homogênea (fração MPP1-I[0,2M]; Figura 19). A análise monossacarídica revelou a presença de altos teores de galactose (41,9%) e ácidos urônicos (36,5%), além de menores quantidades e ramnose (8,8%) (Tabela VI).

Considerando que as RG-I apresentam uma cadeia principal de unidades alternadas de ramnose e ácido galacturônico, numa proporção de 1:1 (Introdução; Figura 4; pág. 9), a presença de unidades ácidas em quantidade muito superior a de ramnose, observada nesta fração, sugere que as ramnogalacturonanas estão em menor proporção quando comparadas as homogalacturonanas.



**Figura 19.** Perfil de eluição (HPSEC) da fração de pectina MPP1-I[0,2M] de plântulas de *A. angustifolia*.

A fração MPP1-I[0,2M] foi carboxi-reduzida, a fim de elucidar o tipo de unidades ácidas presentes na fração. Desta maneira, a fração MPP1-I[0,2M] foi comparada com o seu correspondente carboxi-reduzido, conforme apresentado na Tabela VI.

**Tabela VI.** Composição monossacarídica da fração MPP1-I[0,2M] e seu correspondente carboxi-reduzido.

Fração	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU
MPP1-I[0,2M]	8,8		8,1	3,0	1,3	41,9	1,1	36,5
Carboxi-reduzido	9,4	--	8,0	4,7	2,1	67,1	3,9	5,1



O aumento no teor de galactose na fração carboxi-reduzida foi de aproximadamente 25% em relação aos teores obtidos na fração original. Estes resultados confirmam que a fração péctica MPP1-I[0,2M] é constituída por ácido galacturônico.

A partir da caracterização por  $^{13}\text{C}$ -RMN da fração MPP1-I[0,2M], pode-se observar a presença de um sinal característico para pectina foi confirmada pelo sinal em  $\delta$  175,71 (Figura 20c), referente ao C-6 carboxílico de ácidos urônicos. O C-1 das unidades ácidas foram confirmados pelo sinal  $\delta$  103,16, possivelmente referente a cadeia principal de uma homogalacturonana; esta unidade também pode pertencer a uma RG-I, uma vez que foi identificado um sinal em  $\delta$  101,27, referente às unidades de  $\rightarrow 4\text{-Rha-}\alpha\text{-(1}\rightarrow$ . Uma galactana deve estar ligada a esta pectina, já que foi identificado um sinal proeminente em  $\delta$  104.22 característico de unidades de  $\rightarrow 4\text{-Galp-}\beta\text{-(1}\rightarrow$  (HAZENDONK et al., 1996). Foi ainda identificado um sinal em  $\delta$  99,50, provavelmente uma  $\alpha\text{-Xylp}$ , cuja localização não foi identificada. A existência de pectinas ricas em substituições por galactanas foram relatadas em vagem de feijão (STOLLE-SMITS et al., 1999), folhas de tabaco (EDA e KATO, 1978) e cultura de células de *Linum usitatissimum* (GESHI et al., 2000). Entretanto, galactanas oriundas de parede celular de gimnospermas não são relatadas na literatura.

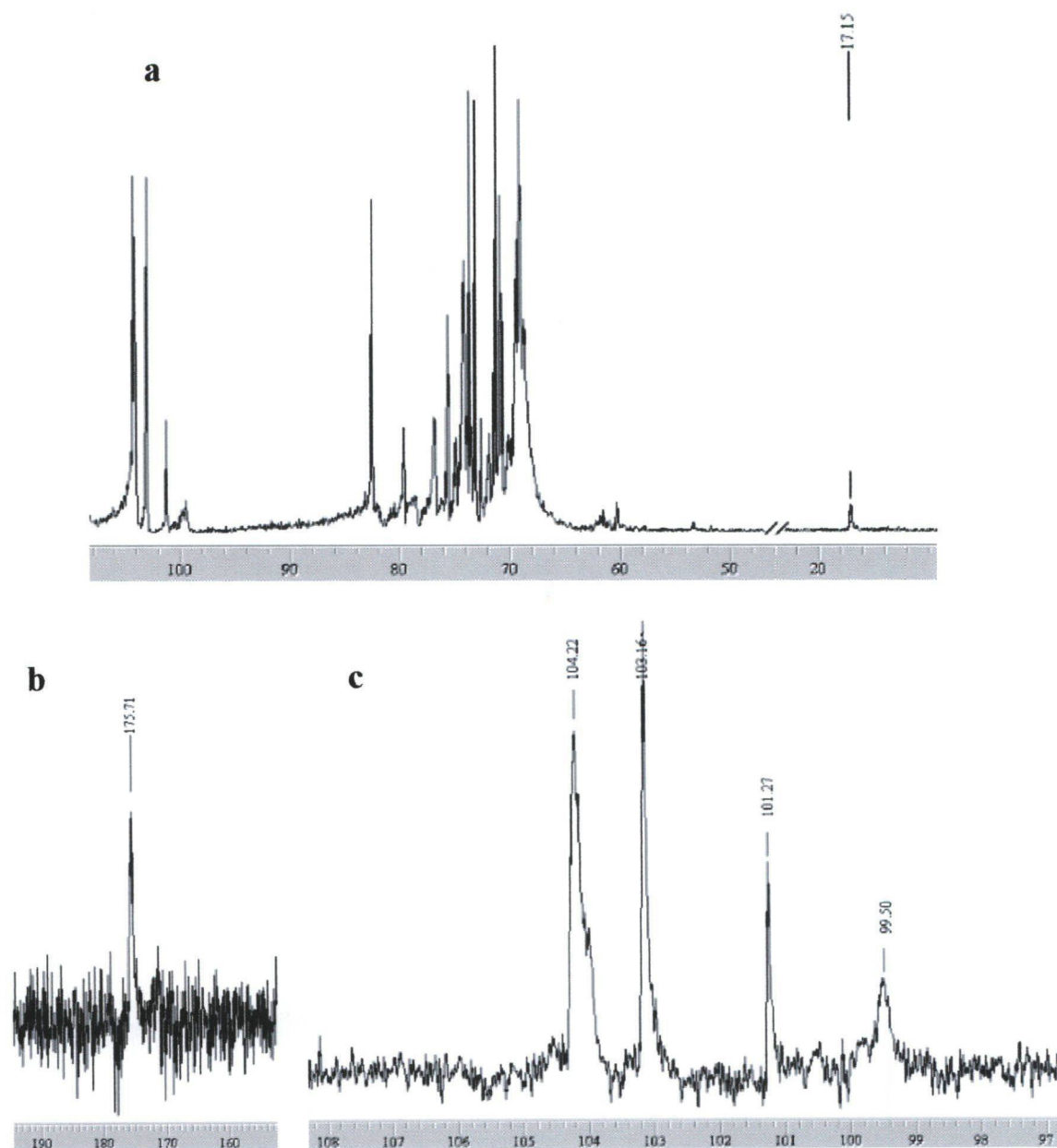


Figura 20. Espectros de RMN da fração MPP1-I[0,2M]. a)  $^{13}\text{C}$ -RMN da região de 10 a 110 ppm; b)  $^{13}\text{C}$ -RMN de C-6 do ácido urônico; c)  $^{13}\text{C}$ -RMN da região anomérica.

### Eluição em NaCl 2 mol/L

O aumento da concentração de sal eluente a 2 mol/L permitiu a obtenção de um material em pequena quantidade (8 mg) e de perfil praticamente

homogêneo (Figura 21), rendendo a fração MPP1-I[2M]. Sua composição apresentou como monossacarídeos principais Rha (13,5%), Ara (37,7%), Gal (22,0%) e ácidos urônicos (21,6%), além da presença de Xyl (4,7%) e Man (0,5%). Apesar de não ser possível uma análise mais apurada sobre a natureza deste polissacarídeo, devido a baixa quantidade de material obtido, pode-se considerar que Rha e ácidos urônicos são indicativos da presença de moléculas de RG-I e estas possivelmente apresentam-se substituídas por arabinogalactanas, constituindo uma pectina tipicamente encontra em paredes primárias.

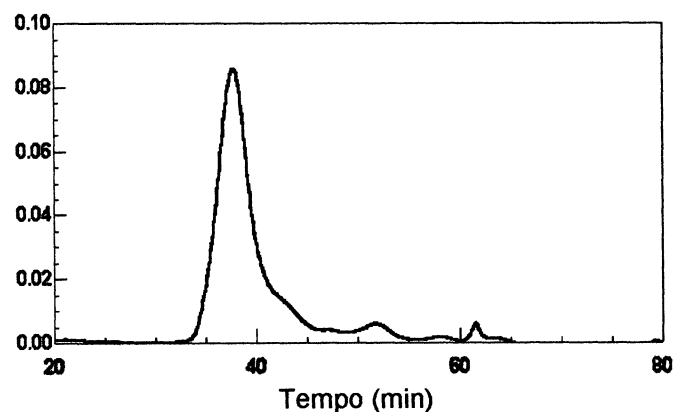


Figura 21. Perfil de eluição (HPSEC) da fração de pectina MPP1-I[2M] de plântulas de *A. angustifolia*.

## b) Análise das frações MPP4-I a MPP10-I

### Eluição em água

Tratamentos sequenciais com KOH e NaOH são eficientes na extração de xiloglucana (ROSE e BENNETT, 1999) e GGM de parede secundária (CAPEK et al., 2000; BOCHICCHIO, 1999). Entretanto, grande quantidade de material péctico foi encontrada em todas as frações extraídas com álcali. A purificação destes

polissacarídeos neutros pôde ser obtida com uma cromatografia de troca iônica (DEAE Trysacryl Cl<sup>-</sup>). Como os maiores rendimentos foram observados para a porção inferior dos caules em todas as frações extraídas com álcali, algumas delas foram submetidas ao fracionamento por cromatografia (MPP5-I[H<sub>2</sub>O], MPP6-I[H<sub>2</sub>O], MPP7-I[H<sub>2</sub>O], MPP8-I[H<sub>2</sub>O] e MPP10-I[H<sub>2</sub>O]). Os produtos eluídos em água foram submetidos à análise por HPSEC e os resultados são apresentados na Figura 22.

Como é possível observar, o aumento de concentração de álcali utilizado na obtenção das frações foi eficiente na separação de dois polissacarídeos principais, confirmados pelos tempos de retenção (TR) e identificados pelos picos I e II de cada polissacarídeo.

A composição monossacarídica apresentada na Tabela VII sugere que xiloglucanas estão presentes nas frações obtidas em concentrações mais diluídas

**Tabela VII.** Composição monossacarídica das frações MPP4-I [H<sub>2</sub>O] a MPP10-I [H<sub>2</sub>O], purificadas por DEAE-Trysacryl Cl<sup>-</sup> (eluição em água).

Fração	Rendimento (g%)*	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
MPP4-I [H <sub>2</sub> O]	15,6	0,5	3,9	13,4	17,8	2,0	18,3	45,1
MPP5-I [H <sub>2</sub> O]	18,7	0,6	5,0	3,6	21,3	1,9	13,2	54,4
MPP6-I [H <sub>2</sub> O]	20,4	0,2	6,3	1,1	27,8	6,6	14,6	43,3
MPP7-I [H <sub>2</sub> O]	16,7	0,4	5,6	0,9	24,0	19,1	15,0	35,0
MPP8-I [H <sub>2</sub> O]	16,0	0,3	4,1	1,6	17,2	26,0	12,8	38,0
MPP10-I [H <sub>2</sub> O]	12,9	0,2	0,1	1,3	0,5	71,9	6,3	19,5

\* Em relação a fração bruta original

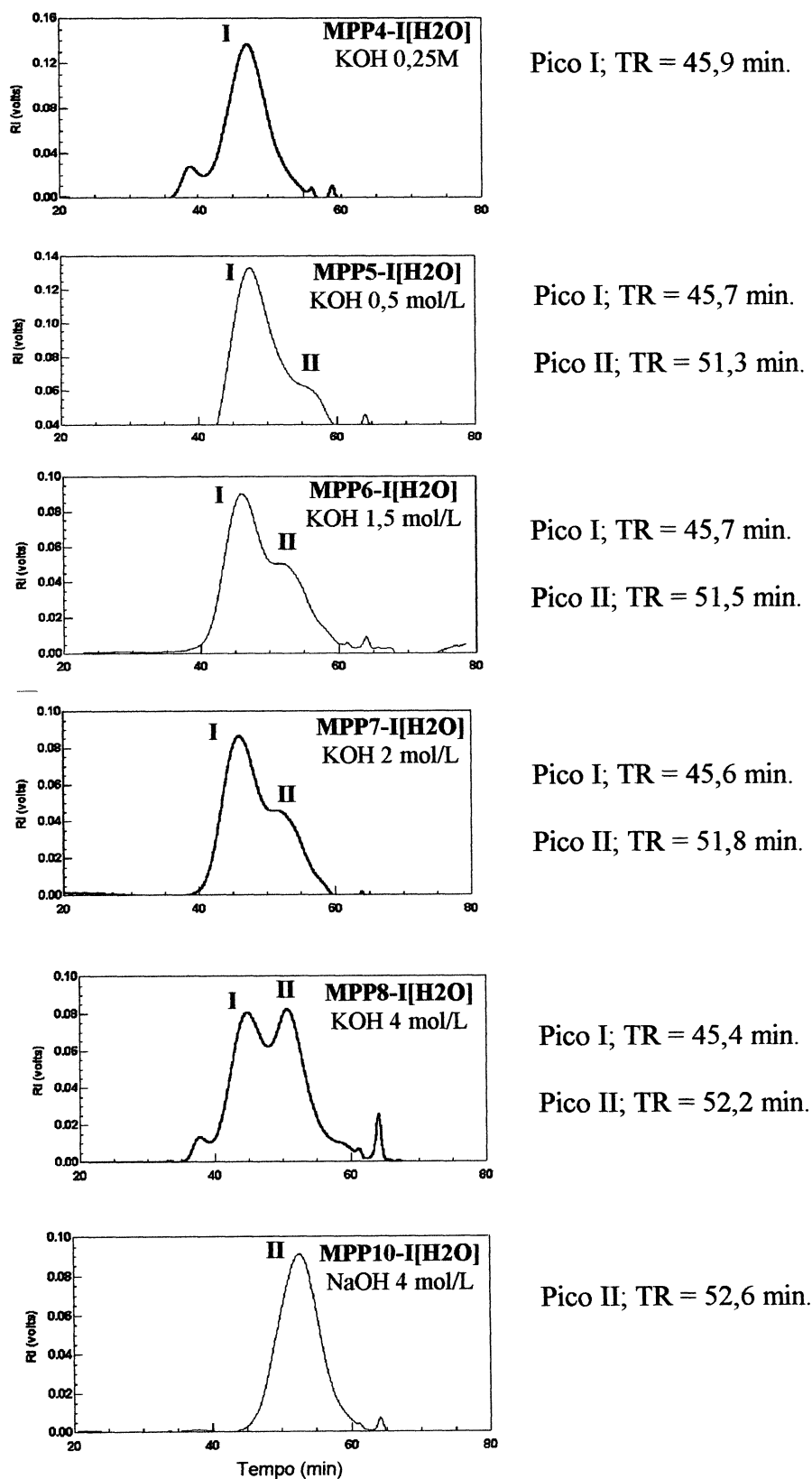


Figura 22. Perfil de eluição (HPSEC) das frações MPP4-I[H<sub>2</sub>O], MPP5-I[H<sub>2</sub>O], MPP6-I[H<sub>2</sub>O], MPP7-I[H<sub>2</sub>O], MPP8-I[H<sub>2</sub>O] e MPP10-I[H<sub>2</sub>O].

de álcali (pico I), pela presença majoritária de seus monossacarídeos constituintes (Glc, Xyl, Gal e Fuc) enquanto as GGM estão nas frações obtidas com soluções mais concentradas (pico II), através dos altos teores de manose, principalmente na fração MPP10-I [H<sub>2</sub>O] (71,9%).

Com o intuito de confirmar a presença de xiloglucanas, a fração MPP5-I[H<sub>2</sub>O] foi submetida à elucidação de sua estrutura, através de método químico de metilação e RMN bidimensional (HMQC). Após a etapa de metilação e hidrólise do polissacarídeo, foi realizada a redução dos derivados parcialmente metilados com boroidreto de sódio deuterado, fundamental para a distinção entre os derivados 2,3 e 3,4-Me<sub>2</sub>-Xyl nos espectros de massa. Os fragmentos de massa principais para o derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Xyl são m/z 117 e 130, enquanto para o derivado 3,4-Me<sub>2</sub> xilitol os fragmentos são m/z 118 e 129. A Tabela VIII apresenta os derivados parcialmente metilados da xiloglucana da fração MPP5-I[H<sub>2</sub>O].

**Tabela VIII.** Monossacarídeos parcialmente metilados da fração MPP5-I[H<sub>2</sub>O].

Derivados metilados	Fragmentos (m/z)	% mol
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	89, 101, 102, 117, 118, 161, 162, 175	13,6
2,3,4- Me <sub>3</sub> -Fuc	89, 102, 118, 131, 161	3,2
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	87, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	1,0
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	87, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	10,3
3,4-Me <sub>2</sub> -Xyl	87, 102, 118, 129, 189	8,8
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	87, 88, 100, 101, 129, 130, 145, 161, 190	5,3
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	87, 99, 102, 113, 118, 129, 162	30,3
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	85, 99, 102, 118, 127, 161, 162, 201	27,3

A porção não-substituída da cadeia principal é representada pelo derivado 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc (30,3%), de ligações do tipo (1→4) enquanto o derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Glc (27,3%) é referente a porção substituída em O-6 por xilose. As unidades de xilose podem ser substituídas em O-2 (3,4-Me<sub>2</sub>-Xyl; 8,8%) por galactose ou não substituídas (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Xyl; 13,6%). As unidades de galactose, por sua vez, podem apresentar-se não substituídas (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal; 10,3%) ou substituídas em O-2 (3,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal; 5,3%) por fucose (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Fuc). A sobreposição dos picos referentes aos derivados 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Xyl e 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Fuc foi resolvida a partir da utilização da coluna capilar DB-210.

Análises por RMN bidimensionais são ferramentas importantes para a identificação de sinais em moléculas cuja região anomérica apresenta-se complexa. Xiloglucanas são moléculas bastante estudadas e complexas, eventualmente apresentando sobreposição de sinais em espectros monodimensionais de <sup>13</sup>C-RMN. Desta maneira, os resultados das análises de metilação foram confirmados pelo espectro de HMQC obtido para a fração MPP5-I [H<sub>2</sub>O], que apresenta o maior percentual relativo de xiloglucana entre todas as frações extraídas com álcali. Alguns assinalamentos já foram descritos em gimnospermas (ACEBES, MORAL E ZARRA, 1993; TAKEUCHI et al. 1996), como para as unidades de Glcp ligadas β (1→4), atribuídas ao sinal em δ 102,57. Já os sinais na região de δ 99 são característicos para Xylp (Figura 23).

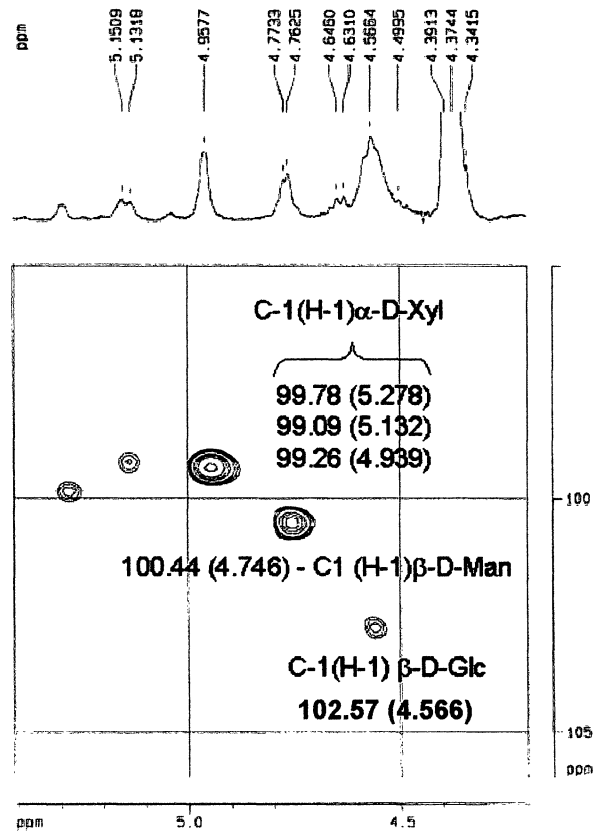


Figura 23. Espectro de correlação  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HMQC) da região anomérica da fração MPP5-I[H<sub>2</sub>O].

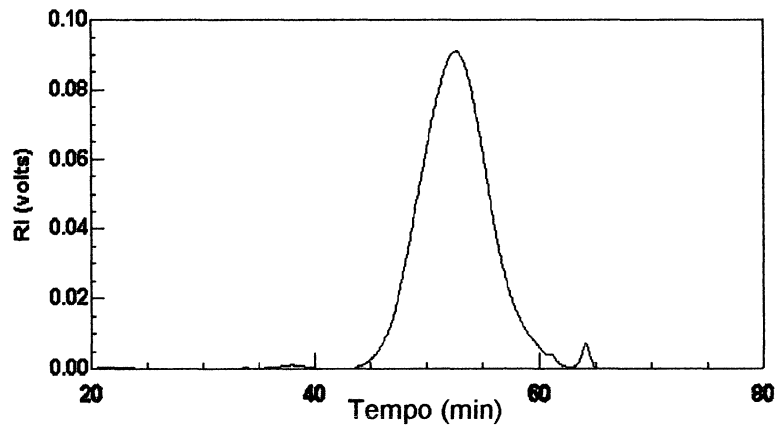
As unidades Fucp  $\alpha(1\rightarrow2)$  foram confirmadas pelo sinal em  $\delta$  16,24, referente ao grupamento metil na posição O-6.

A estrutura química das xiloglucanas de *A. angustifolia* sugere uma similaridade em relação àquelas encontradas em angiospermas (BUSATO, 2001; McNEIL et al., 1984; VARNER e LIN, 1989; VIERHUIS, et al., 2000; WHITCOMBE et al., 1995).

Já a fração MPP10-I[H<sub>2</sub>O] apresentou-se homogênea (Figura 24) e também foi utilizada para a caracterização estrutural. A análise das composições monossacarídicas apresentou Man (58,9%), Glc (17,6%), Gal (8,7%) Ara (9,6%),



Xyl (4,4%), Rha (0,3%), Fuc (0,5%), indicando proporções típicas de uma GGM de parede secundária, exceto pela presença de uma quantidade de galactose maior.



**Figura 24.** Perfil de eluição (HPSEC) da fração MPP10-I[H<sub>2</sub>O], referente a porção inferior dos caules de *A. angustifolia*.

É importante observar que a galactose poderia ser componente tanto da GGM como para arabinogalactana, possivelmente presente nesta fração. Esta dúvida pôde ser resolvida pela análise de metilação, apresentada na Tabela IX. A estrutura de uma GGM foi caracterizada pela presença dos derivados 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man e 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc, característico da cadeia principal de unidades alternadas de Manp e Glcp ligadas (1→4), numa proporção de ~3,5:1, mostrando-se uma típica GGM de gimnospermas (FENGEL E WEGENER, 1989).

**Tabela IX.** Análise dos monossacarídeos parcialmente metilados da fração (MPP10-I[H<sub>2</sub>O]) de GGM de *A. angustifolia*, obtida por extração com KOH 4 mol/L e fracionada com DEAE-Trysacryl (eluição com água).

Derivados metilados	Fragmentos (m/z)	mol %
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	99,101,113,117,129,131,161,173	65,0
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	99,101,113,117,129,131,161,173	17,6
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	87,101,117,129,145,161,205	1,6
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	87,101,117,129,145,161,205	0,5
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	87,101,117,129,145,161,205	8,4
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	87,101,117,129,143,203	4,2
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	87,101,117,129,143,203	2,7

A presença de galactose foi identificada pelo derivado 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal (8,4%), a qual foi confirmada como constituinte da GGM pelos derivados 2,3-Me<sub>2</sub>-Man (4,2%) e 2,3-Me<sub>2</sub>-Glc (2,7%), relativos a substituição das unidades de Man<sub>p</sub> e Glc<sub>p</sub>, ambos na posição O-6, por unidades simples de galactose.

#### Eluição em NaCl 0,2 mol/L

Uma vez que todas as frações por extração alcalina apresentam teores elevados de ácidos urônicos, a fração MPP7-I foi submetida a cromatografia de troca iônica, a fim de fracionar polissacarídeos ácidos. Após eluição com água (fração MPP7-I[H<sub>2</sub>O]), a fração MPP7-I foi em seguida eluída com NaCl 0,2 mol/L (fração MPP7-I[0,2M]), cujo rendimento alcançado foi de 29%, em relação à fração total aplicada na coluna. Seu perfil de eluição, determinado em análise por HPSEC

(Figura 25) apresentou um pico majoritário e a composição monossacarídica resultou em Rha (3,0%), Ara (9,4%), Xyl (45,0%), Man (2,7%), Gal (16,6%) e ácidos urônicos (10,1%), sugerindo a presença de uma arabinoxilana (AGX) e menores quantidades de xiloglucana, identificado pela presença de Fuc (3,2%) e Glc (8,9%).

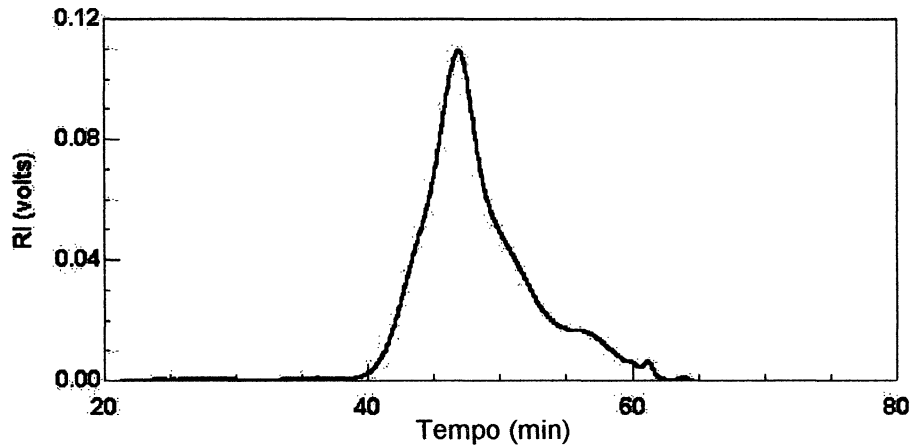


Figura 25. Perfil de eluição (HPSEC) da fração MPP7-I[0,2M], obtida dos caules de plântulas de *A. angustifolia*.

A presença de uma AGX pôde ser confirmada pela análise de seus derivados metilados, conforme apresentado a seguir:

Tabela X. Análise dos monossacarídeos parcialmente metilados da fração MPP7-I[0,2M] de plântulas de *A. angustifolia*.

Derivados metilados*	Fragmentos (m/z)	mol%
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	87, 101, 102 118, 129, 161	11,8
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	87, 102, 118, 129, 190	6,9
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	87, 102, 118, 129, 190	50,1
2-Me-Xyl	85, 87, 99, 113, 117, 129, 145, 159, 189	19,7
3-Me-Xyl	87, 88, 129, 130, 189, 190	11,5

\* Os derivados metilados referentes à molécula de xiloglucana foram omitidos.

Os derivados confirmam a estrutura de AGX com uma cadeia principal de unidades de Xylp ligadas (1→4) (2,3-Me<sub>2</sub>-Xyl; 50,1%) com substituições por Araf em O-3, identificados pelos derivados 2-Me-Xyl, cujo teor obtido (19,7%) corresponde aos derivados de arabinose obtidos, 2,3,5-Me<sub>3</sub>-Ara e 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara, que somados, renderam 18,7%. A cadeia principal é ainda substituída na posição O-2 por ácidos urônicos, identificado pelo derivado 3-O-Me-Xyl, correspondente ao teor de ácidos urônicos de 10,1%. O derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara (6,9%) refere-se a substituições na posição O-5 das unidades de Araf, cuja análise de metilação não foi suficiente para determinar qual componente estaria ligado a estas unidades.

## **4.2. Polissacarídeos do xilema de *A. angustifolia***

### **4.2.1. Obtenção e caracterização geral do material de pesquisa**

A seção do tronco utilizada durante o trabalho (Materiais e Métodos, item 3.2b) foi escolhida de acordo com o modelo de crescimento existente para os vegetais arborescentes. Considerando que as camadas de crescimento no tronco são como uma série de cones sobrepostos uns sobre os outros, é importante para se determinar a idade de uma árvore, que a amostra seja retirada a altura próxima da base do fuste. A partir da árvore escolhida (cerca de 10 metros de altura), a seção selecionada foi de 50 cm (partindo-se da base do tronco), a qual abrange praticamente todas as idades do vegetal.

GREEN (1963) reportou a eficiência do processo de deslignificação considerando três pontos de vista: a remoção de quantidade máxima de lignina;

retenção de uma quantidade máxima de carboidratos e a degradação mínima dos polissacarídeos. Entretanto, outros autores relataram a degradação de polissacarídeos neste tipo de tratamento (ABDEL-HAFIZ, 1995; HEBEISH et al., 1997). Desta forma, BOCHICCHIO, GANTER e REICHER (2000) propuseram uma modificação na metodologia para o processo de deslignificação do xilema, em *Podocarpus lambertii*, reduzindo para a metade a concentração dos reagentes empregados pelo método descrito por TIMELL (1965a).

Assim, o xilema de *A. angustifolia*, moído e deslipidificado, foi submetido a tratamentos seqüenciais com água (extração de pectinas), DMSO (extração de amido) e finalmente deslignificado com solução de clorito de sódio em meio ácido (ácido acético). A holocelulose (celulose + hemiceluloses) residual foi submetida a extração das hemiceluloses com soluções alcalinas (NaOH e KOH), solventes largamente empregados na extração de polissacarídeos da parede celular. O emprego inicial do KOH é justificado principalmente por sua seletividade na extração de xilanas, enquanto o NaOH extrai polissacarídeos de maneira não específica (TIMELL, 1964; BOCHICCHIO, 1999; CAPEK et al., 2000). Além disso, a formação do acetato de potássio durante a neutralização do extrato alcalino, sal mais solúvel em etanol que o acetato de sódio, durante o processo de precipitação polissacarídica também justifica o amplo emprego do KOH (FENGEL e WEGENER, 1989). Desta maneira, foram realizadas as extrações sequenciais dos polissacarídeos, conforme apresentado no Fluxograma III (Materiais e Métodos).

Uma informação preliminar à respeito da constituição de polissacarídeos na parede celular pode ser obtida a partir de uma hidrólise total do material bruto. Assim, o material deslipidificado e moído de *A. angustifolia* foi submetido à

hidrólise de Saeman (SAEMAN et al., 1954), apresentando Rha (1,3%), Ara (4,4%), Xyl (15,9%), Man (36,0%), Gal (7,1%) e Glc (35,3%) (Tabela XI). Estes resultados sugerem uma mistura de arabinoxilanas e glucomananas. É importante ressaltar que o conteúdo de glucose observado provém das hemiceluloses bem como da hidrólise parcial da celulose.

#### 4.2.2. Análise das frações extraídas com KOH

Considerando que BOCHICCHIO (1999) verificou que KOH 1 mol/L extraiu cerca de 90% de hemiceluloses do caule de *P. lambertii* (15,8 g% em relação ao material de partida), o processo de extração para *A. angustifolia* foi iniciado com KOH 0,25 mol/L (Tabela XI), a fim de se observar a existência de diferentes famílias de AGX, como já reportado para espécies de cereais (DU PONT e SELVENDRAN, 1987; IZYDORCZYK e BILIADERIS, 1995; SUN, LAWThER e BANKS, 1996). Esta concentração de álcali permitiu extrair 34,8% de material hemicelulósico (4 g% em relação ao material de partida), com elevado grau de substituição por Ara (Xyl:Ara 3,5:1). As subseqüentes extrações (KOH 0,5 mol/L até KOH 4 mol/L; frações A-7 até A-10) renderam cerca de 7,5 g% de hemiceluloses com grau de substituição inferior. A distribuição de AGX de *A. angustifolia* (A-6 até A-12) foi analisada a partir de seus perfis de eluição, determinados por HPSEC-MALLS (Figura 26). Foi verificado que a fração A-6, correspondente à extração com KOH 0,25 mol/L, apresentou um pico praticamente homogêneo (pico II).

Tabela XI. Determinação da composição de açúcares neutros das hemiceluloses e dosagem de ácidos urônicos e fenólicos do xilema de *A. angustifolia*.

Fração	Rend. (g%) <sup>a</sup>	Composição monossacarídica (mol%)								Fenólicos (%) <sup>c</sup>
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácidos Urônicos <sup>b</sup>	
Resíduo inicial	--	1,3	tr	4,4	15,9	36,0	7,1	35,3	nd	nd
<b>A-6</b> (KOH 0,25 mol/L)	4,0	1,6	tr	14,2	49,4	3,6	8,0	6,1	17,1	20,0
<b>A-7</b> (KOH 0,5 mol/L)	1,3	0,9	tr	10,6	57,6	7,9	6,1	3,3	13,6	16,0
<b>A-8</b> (KOH 1 mol/L)	1,4	0,6	tr	9,0	49,1	12,2	4,8	5,3	19,0	10,4
<b>A-9</b> (KOH 2 mol/L)	1,8	0,6	0,2	7,9	43,3	16,1	5,2	6,0	20,1	6,4
<b>A-10</b> (KOH 4 mol/L)	0,6	0,3	0,3	8,5	42,1	25,7	3,4	6,1	13,5	10,0
<b>A-11</b> (NaOH 1 mol/L)	0,4	0,3	tr	2,9	12,4	57,6	5,2	15,6	6,4	7,2
<b>A-12</b> (NaOH 4 mol/L)	2,0	0,8	tr	1,7	7,3	67,9	2,1	15,7	4,5	4,4
<b>Resíduo Final</b>	--	0,1	tr	4,5	12,3	36,7	5,8	50,6	nd	nd

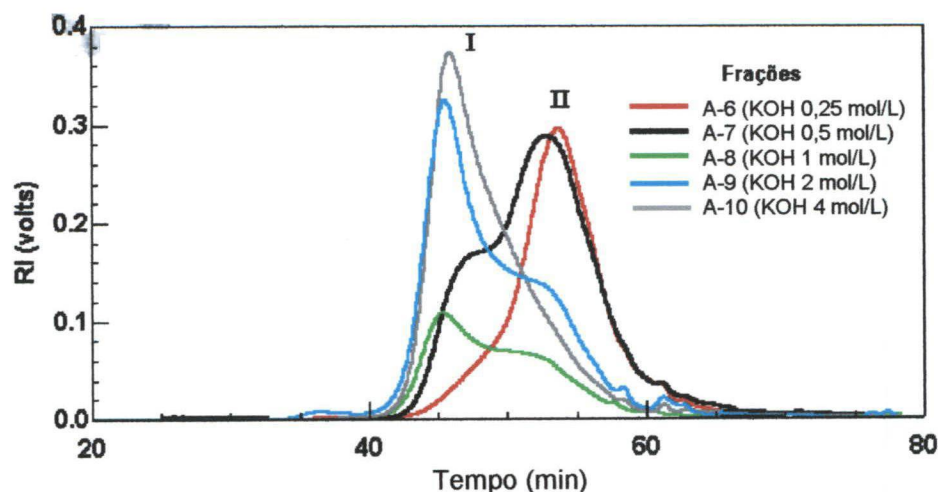
<sup>a</sup> A partir do material deslipidificado

<sup>b</sup> Determinação pelo método de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973)

<sup>c</sup> Determinação pelo método HARTREE (1972); ácido coniferílico como padrão.

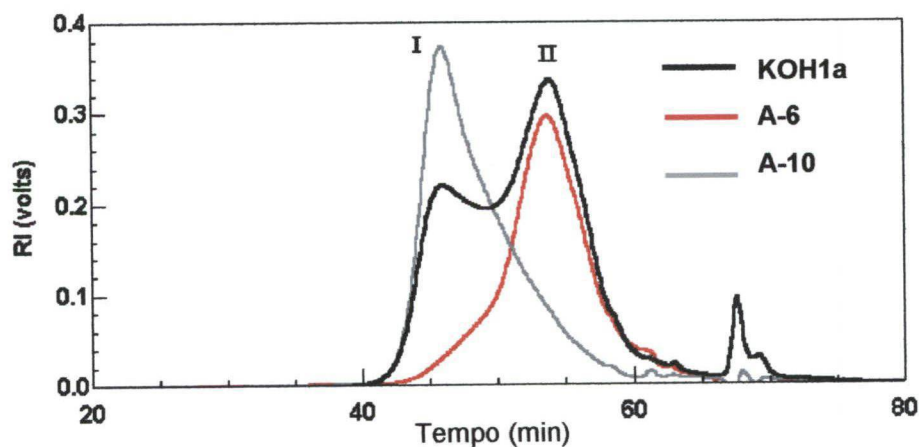
tr = traços

O aumento progressivo da concentração de álcali permitiu a liberação cada vez mais intensa de uma segunda população de AGX de massa molecular maior (pico I), culminando com a fração A-10, relativa à extração com KOH 4 mol/L que apresentou um perfil de eluição homogêneo de AGX de alta massa molecular (Figura 26). Importante observar que a contaminação de GGM nas frações A-6 a A-10 pôde ser eliminada por filtração em membranas de 0,22 µm, uma vez que este polissacarídeo apresenta baixa solubilidade em água.



**Figura 26.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações A-6 a A-10, obtidas por extração com KOH (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mol/L), respectivamente, em xilema de *A. angustifolia*.

Quando os perfis de AGX de *A. angustifolia* foram comparados ao obtido para a fração de *P. lambertii*, a partir de extração direta com KOH 1 mol/L (fração KOH1a), foi observada uma sobreposição referente aos dois picos de AGX (Figura 27).



**Figura 27.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com KOH 0,25 mol/L (A-6) e KOH 4mol/L (A-10) de *A. angustifolia* e fração extraída diretamente com KOH 1 mol/L (KOH1a), de *P. lambertii*.



AGX de cereais, por exemplo, são conhecidas por apresentar um alto grau de heterogeneidade (IZYDORCZYK e BILIADERIS, 1995), justificado pela enorme variação de massas moleculares obtidas para este grupo de vegetais, desde  $6,5 \times 10^4$  para AGX de trigo (ANDREWARTHA, PHILLIPS e STONE, 1979),  $1,2 \times 10^5$  em centeio (NILSSON et al., 2000) até  $5 \times 10^6$  em AGX de cevada (McGREGOR e FINCHER, 1993).

Desta maneira, as frações A-10 e A-6, relativas aos picos I e II, respectivamente, de perfis praticamente homogêneos, foram submetidas a determinação de suas massas moleculares.

Nas análises por HPSEC, a detecção quantitativa dos polissacarídeos é realizada por índice de refração. Quando o interesse é determinar as massas moleculares médias, é necessária a determinação do índice  $dn/dc$ , que representa a resposta de detecção por índice de refração frente a uma solução (WYATT, 1993). O valor encontrado para as frações A-6 (0,210 mL/g) e A-10 (0,180 mL/g) difere substancialmente dos valores encontrados para AGX anteriormente estudadas, como em folhas de *Cladium mariscus* (0,145 mL/g) (BOCHICCHIO et al., 2003), trigo (0,146 mL/g) (DERVILLY-PINEL, THIBAUT e SAULNIER, 2002) e centeio (0,147 mL/g) (NILSSON et al., 2000). Estes valores diferenciados do  $dn/dc$  de A-6 e A-10 podem estar relacionados com a presença de fenólicos, confirmada em todas as frações (Tabela XI), a partir de dosagens pelo método descrito por HARTREE (1972), originalmente usado para dosagem de proteínas e que vem sendo utilizado também para dosar fenólicos totais (BOCHICCHIO et al., 2000), uma vez que o conteúdo protéico no xilema é ínfimo. Como exemplo, BOCHICCHIO (1999) determinou os teores de proteínas para outra espécie de

gimnosperma, *Podocarpus lambertii*, utilizando os métodos de Peterson e Kjeldahl, apresentando um conteúdo aproximado de 0,75%, por ambos os métodos. No entanto, a presença de fenólicos ligados a hemiceluloses já foi extensivamente descrita para arabinoxilanas de gramíneas (WHITMORE, 1974; KATO e NEVINS, 1985; GRAHAN et al., 1995),

A partir da determinação de  $dn/dc$ , o cálculo para as massas moleculares médias das frações estudadas resultou em  $M_w \sim 1,32 \times 10^4$  (A-6) e  $M_w \sim 3,72 \times 10^4$  (A-10), valores abaixo daqueles encontrados para AGX de monocotiledôneas.

### **Caracterização estrutural das frações A-6 e A-10**

As principais frações de AGX de *A. angustifolia* (frações A-6 e A-10) foram submetidas à elucidação estrutural por métodos químicos (metilação) e espectroscópicos ( $^{13}\text{C}$ -RMN).

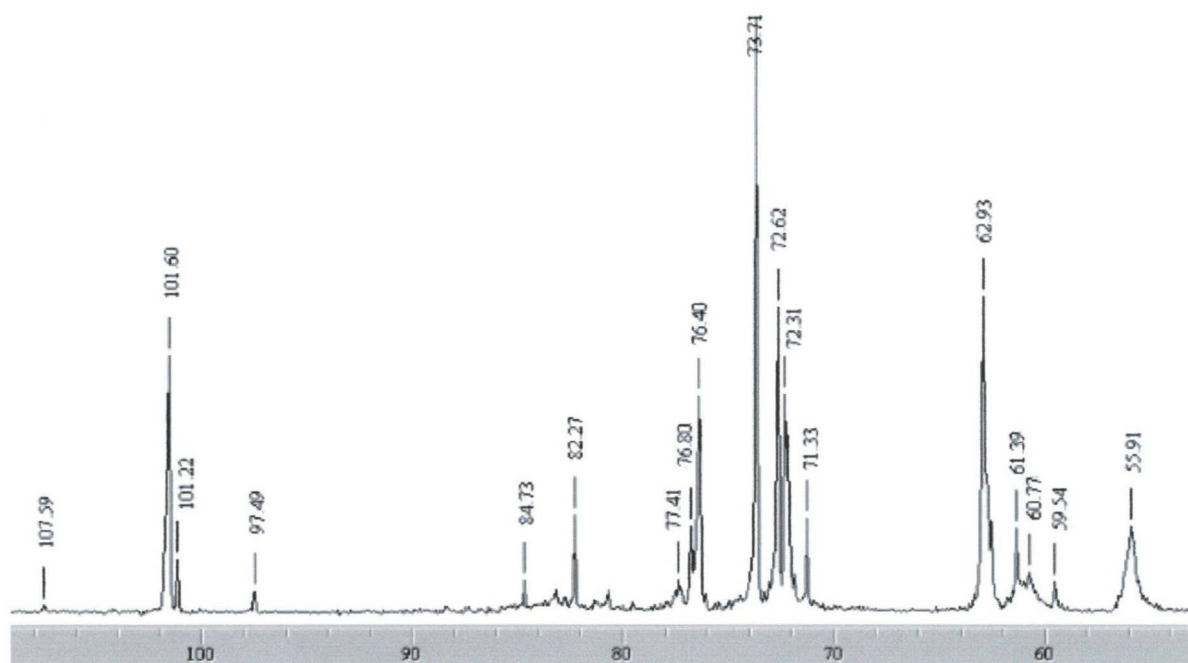
A análise de metilação foi realizada a partir da obtenção dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, identificados por GC-MS. As frações de AGX analisadas (A-6 e A-10) foram comparadas com a principal fração de AGX de *Podocarpus lambertii* (fração KOH1a). Os resultados estão apresentados na Tabela XII.

**Tabela XII.** Análise dos monossacarídeos parcialmente metilados das arabinoxilanas ácidas de *A. angustifolia* (frações A-6 e A-10) e *P. lambertii* (KOH1a).

Derivados metilados	Fragmentos (m/z)	<i>P. lambertii</i> <i>A. angustifolia</i>		
		(KOH1a)	A-6	A-10
		mol%		
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	87, 101, 117, 129, 145, 161	12,3	16,3	15,1
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	87, 101, 117, 129, 189	3,2	--	--
6-deoxy-2 Me-Hex	87, 99, 117, 129, 159, 173, 201	1,2	--	--
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	87, 101, 117, 129, 145, 161	3,2	3,0	1,5
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	87, 101, 117, 129, 161, 189	59,8	61,3	63,4
6-deoxy-3-Me-Hex	87, 101, 117, 129, 143, 189, 203	1,3	--	--
2-Me-Xyl	85, 87, 99, 113, 117, 129, 145, 159, 189	9,0	9,8	10,7
3-Me-Xyl	85, 87, 99, 113, 117, 129, 145, 159, 189	10,0	9,6	9,3

As ligações (1→4) da cadeia principal de A-6 e A-10 (*A. angustifolia*) foram identificadas através do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Xyl, o qual é parcialmente substituído em O-3 por arabinose (2,3,5 Me<sub>3</sub>-Ara) ou ácidos urônicos provavelmente em O-2. As frações de AGX de *A. angustifolia* são similares também a uma AGX de *P. lambertii*, exceto pela presença neste último, do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara e de derivados de fucose e ramnose (BOCHICHIO, 1999).

Os dados de metilação foram complementados pela análise por <sup>13</sup>C-RMN. O espectro obtido para a fração A-6 apresentou boa definição dos sinais, possuindo quatro sinais na região dos carbonos anoméricos, correspondendo a β-D-Xylp, substituída em O-3 e/ou O-2 (δ 101,224) e não-substituído (δ 101,60) com unidades de α-L-Araf ligadas em O-3 de xilose da cadeia principal (δ 107,59) (Figura 28; Tabela XIII).



**Figura 28.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da AGX da fração obtida por extração com KOH 0,25 mol/L da holocelulose de *A. angustifolia* (fração A-6) (solubilizada em  $\text{D}_2\text{O}$ ).

Unidades  $\beta$ -Xylp 4-O-substituídas na cadeia principal foram confirmadas pelo sinal em 76,40. Sinal de C-5 a  $\delta$  62,93 e  $\delta$  61,39 foram atribuídos às unidades de xilopiranoose e arabinofuranose, respectivamente.

Unidades de  $\alpha$ -ácido urônico substituintes da cadeia principal de xilana são relatadas na literatura como sendo 4-O-metilglucurônico, onde o sinal em  $\delta$  176,77 é atribuído ao C-6 carboxilado,  $\delta$  97,49 ao C-1 e  $\delta$  59,54 ao grupamento  $\text{OCH}_3$ , além do sinal em  $\delta$  82,27 de C-4 das unidades de ácidos urônicos ligadas ao grupamento metil (C-OCH<sub>3</sub>) Estes sinais estão de acordo com outros trabalhos sobre RMN de AGX (BAZUS et al., 1993; COIMBRA, WALDRON e SELVENDRAN, 1994; IZYDORCZYK e BILIADERIS, 1994; PINTO, MARTÍNEZ e RIVAS, 1994; SUN et al., 1996; WENDE e FRY, 1997).

O sinal proeminente em  $\delta$  55,91 pode ser atribuído a grupamentos metoxil, provenientes da lignina. Este derivado, provavelmente gerado após a deslignificação, já foi identificado por WALLACE et al. (1995), em estudos de fenólicos de gramíneas e por BOCHICCHIO (1999), estudando hemiceluloses de *Podocarpus lambertii*.

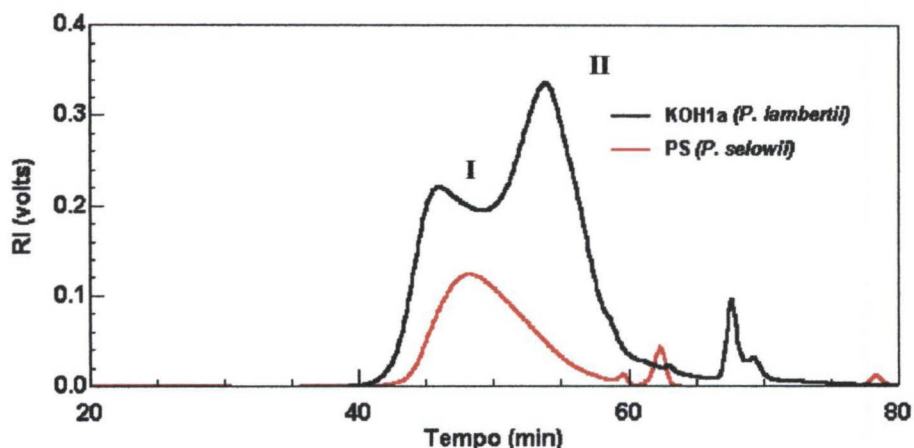
**Tabela XIII.** Determinação dos sinais correspondentes aos carbonos da fração A-6, a partir de análise por  $^{13}\text{C}$ -RMN.

	Deslocamento químico (ppm)				
	C-1	C-4	C-5	C-6	OMe
$\rightarrow 4$ )- $\beta$ Xylp-(1-	101,60	76,40	62,93	--	
$\rightarrow 4$ )- $\beta$ Xylp-(1- substituído	101,22			--	
$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ Araf-(1-	107,59		61,39	--	
$\rightarrow 2$ )-4-OMe- $\alpha$ GlcAp-(1-	97,49			176,77	59,54

#### 4.2.3. Análise de arabinoxilanas de *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus selowii*

Experimentos realizados pelo autor, utilizando gimnospermas nativas do Brasil, como do gênero *Podocarpus* (*P. lambertii* e *P. selowii*) contribuíram para o estudo da distribuição de AGX na parede celular. Uma amostra de xilema de *P. lambertii* (Fração KOH1a), previamente deslignificada, e outra amostra de *P. selowii* não submetida a este tratamento e extraída com álcali concentrado (KOH 4 mol/L; Fração PS), foram analisados por HPSEC. Considerando que a fração KOH1a apresenta dois picos (I e II), a amostra de *P. selowii*, não tratada, que

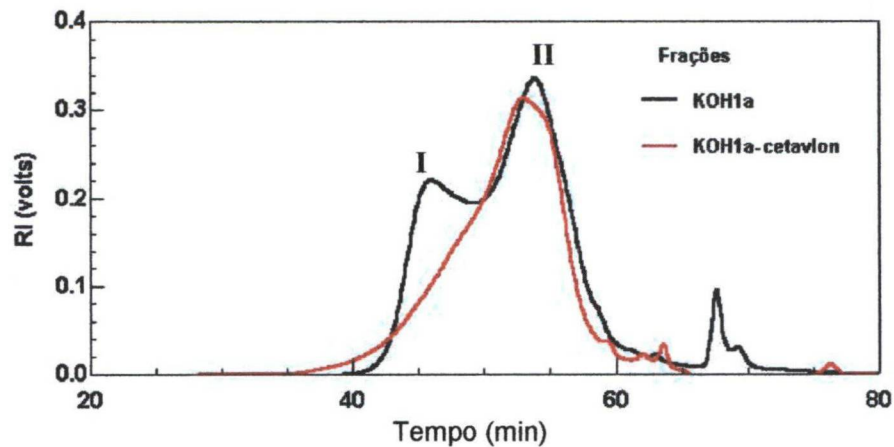
apresentou um perfil contendo apenas um pico, provavelmente é referente a AGX de maior massa molecular (pico I, Figura 29). Possivelmente, a AGX referente ao pico II interage fortemente com a lignina, uma vez que o processo de deslignificação permitiu sua extração com KOH.



**Figura 29.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações deslignificadas de *P. lambertii* (fração KOH1a) e não-deslignificadas, de *P. selowii* (fração PS).

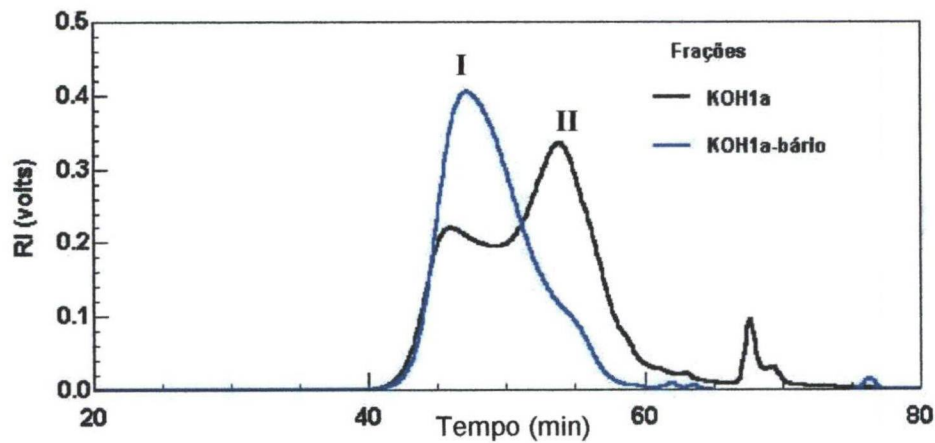
Possíveis interações moleculares entre xilanas e lignina já foram descritas anteriormente (SARKANEN e HERGERT, 1971; MORRISON, 1974; AZUMA, TAKAHASHI e KOSHIJIMA, 1981; DAS et al., 1981; REICHER e CORRÊA, 1982; JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1993; BIKOVA e TREIMANIS, 2002).

Extrações iniciais com KOH concentrado forneceram as duas populações de AGX, o que motivou o emprego de alguns procedimentos de purificação dos picos I e II. A fração KOH1a, obtida por extração da holocelulose de *Podocarpus lambertii* e extraída com KOH 1 mol/L, foi inicialmente testada com uso de sal de amônio quaternário (CETAVLON), numa proporção de polissacarídeo:CETAVLON (3:5). Este tratamento mostrou-se eficiente na purificação da AGX de baixa massa molecular (pico II) (Figura 30).



**Figura 30.** Perfil de eluição (HPSEC) da arabinoxilana de *P. lambertii*, extraída com KOH 1 mol/L (fração KOH1a) (—) e seu tratamento com CETAVLON (fração KOH1a-cetavlon) (—).

Em contrapartida, o emprego de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  saturado, normalmente empregado para solubilizar GGM de parede (MEIER, 1965), foi seletivo na purificação da AGX de alta massa molecular (Figura 31).



**Figura 31.** Perfil de eluição (HPSEC) da arabinoxilana de *P. lambertii*, extraída com KOH 1 mol/L (fração KOH1a) (—) e seu tratamento com  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (fração KOH1a-bário) (—).

A partir dos resultados apresentados pelas análises por HPSEC e elucidação estrutural de arabinoxilanas de *Araucaria angustifolia*, *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus selowii*, é possível sugerir um padrão de ocorrência de dois tipos principais de AGX da parede celular de espécies de gimnospermas, diferindo entre si apenas em relação às massas moleculares, uma vez que suas estruturas moleculares são similares.

#### **4.2.4. Análise das frações extraídas com NaOH**

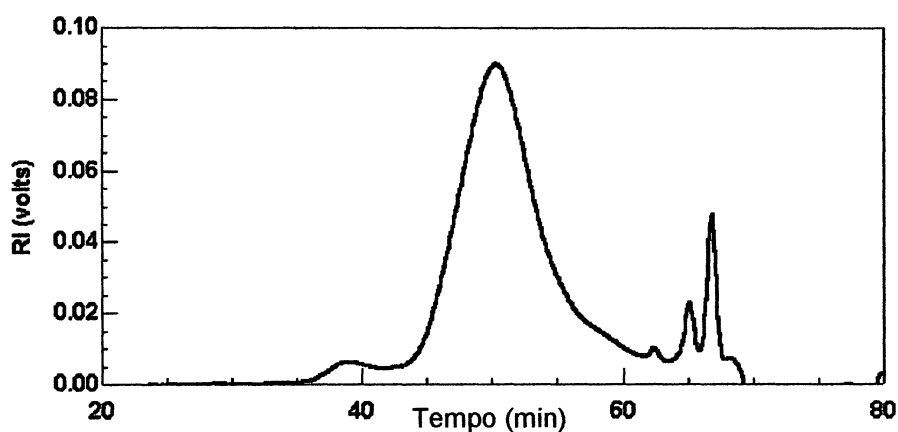
Nos experimentos realizados com *P. lambertii*, sucessivos tratamentos com KOH extraíram AGX, enquanto o último tratamento com NaOH solubilizou as GGM ainda disponíveis na parede celular (fração NaOH-a) (BOCHICCHIO, 1999). Da mesma maneira, a extração final com NaOH em *A. angustifolia* rendeu frações de GGM praticamente puras (frações A-11 e A-12; Tabela XI; pág. 77). A fração A-11 apresentou uma relação Man:Glc:Gal (3,7:1:0,1) e a fração A-12 uma Man:Glc:Gal (4,3:1:0,1), ambas mostrando-se típicas para GGM de gimnospermas anteriormente relatadas (FENGEL e VEGENER, 1989). Entretanto, a fração A-12 apresenta um conteúdo menor de AGX contaminantes, sendo, portanto a fração escolhida para ser submetida a análise estrutural.

##### **➤ Caracterização estrutural da fração A-12**

A baixa solubilidade em água (característico de GGM de parede) impossibilitou a análise por HPSEC, uma vez que o material permaneceu retido na membrana de filtração. Para resolver este problema, o material foi previamente



solubilizado com NaOH 0,5 mol/L, na presença de NaBH<sub>4</sub> e posteriormente dialisado. A solução concentrada permaneceu solúvel, sendo desta maneira possível sua análise por HPSEC. O perfil de eluição obtido mostrou-se homogêneo, conforme apresentado na Figura 32.



**Figura 32.** Perfil de eluição (HPSEC) da fração de GGM, obtida por extração com NaOH 4 mol/L da holocelulose de *A. angustifolia* (fração A-12).

A fração A-12 (GGM), selecionada para elucidação de sua estrutura química parcial, foi comparada com a principal fração de GGM de *P. lambertii* (fração NaOH-a) (BOCHICCHIO, 1999).

A metilação da fração A-12 resultou nos derivados metilados mostrados na Tabela XIV. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados das frações A-12 e NaOH-a mostraram-se consistentes com a relação Man:Glc:Gal apresentados na composição monossacarídica.

Os derivados 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man e 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc correspondem às unidades manosil e glucosil ligadas (1→4) na cadeia principal, sendo eventualmente substituídas por galactose em O-6. Na fração NaOH-a (*P. lambertii*), somente

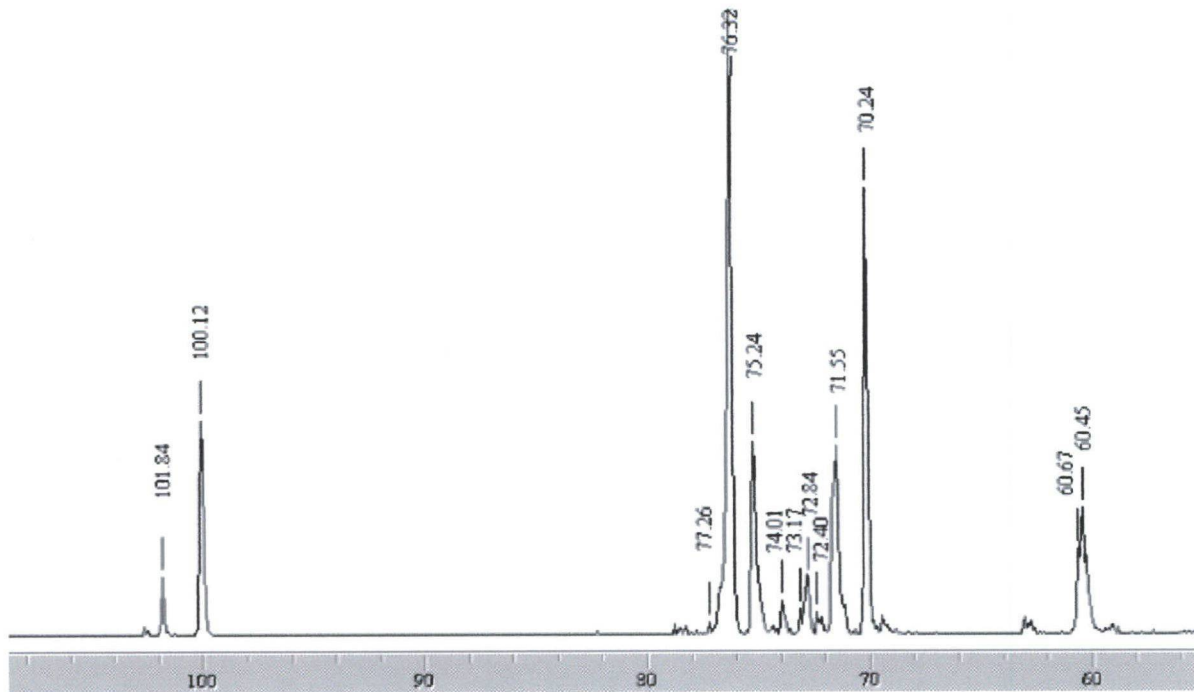
manose é substituída, enquanto na fração A-12 de *A. angustifolia* tanto unidades manosil quanto glucosil apresentam derivados correspondentes a substituição (2,3-Me<sub>2</sub>-Man e 2,3-Me<sub>2</sub>-Glc).

**Tabela XIV.** Análise dos monossacarídeos parcialmente metilados das frações de GGM de *A. angustifolia* (fração A-12) e *P. lambertii* (fração NaOH-a).

Derivados metilados	Fragmentos (m/z)	<i>P. lambertii</i>	<i>A. angustifolia</i>
		(NaOH-a)	(A-12)
		mol %	
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	99,101,113,117,129,131,161,173	70,8	75,2
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	99,101,113,117,129,131,161,173	23,3	19,0
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	87,101,117,129,145,161,205	1,8	1,0
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	87,101,117,129,145,161,205	0,8	0,4
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	87,101,117,129,145,161,205	1,1	1,5
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	87,101,117,129,143,203	2,0	1,8
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	87,101,117,129,143,203	--	1,1

Com os resultados obtidos, as GGM da parede secundária de *A. angustifolia* apresentaram-se similares a outras anteriormente encontradas para espécies de gimnospermas (ASPINALL, 1959; CROON e LINDBERG, 1958; DUTTON e HUNT, 1960; KOOIMAN e ADAMS, 1961; TYMINSKI e TIMELL, 1960; CAPEK et al., 2000; BOCHICCHIO, 1999).

A confirmação dos resultados obtidos para a metilação foi realizada por análise de <sup>13</sup>C-RMN da fração A-12, a qual resultou em doze sinais característicos de uma molécula de GGM (Figura 33; Tabela XV).



**Figura 33.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da GGM (fração A-12) de *A. angustifolia*, em NaOD 1%.

O baixo teor de galactose não permitiu a visualização de seus assinalamentos no espectro. Os sinais dos carbonos anoméricos de  $\beta$ -Manp ( $\delta$  100,12) e  $\beta$ -Glc p ( $\delta$  101,84) foram atribuídos (Tabela XV).

**Tabela XV.** Determinação dos sinais correspondentes aos carbonos da fração A-12, a partir de análise por  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Ligação	Deslocamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\rightarrow$ 4)-Manp-(1-	100,12	70,24	71,55	76,32	74,01	60,67
$\rightarrow$ 4)-Glc p-(1-	101,84	72,40	75,24	77,26	73,17	60,45

### 4.3. Dinâmica de crescimento

A biossíntese dos componentes da parede e suas alterações durante o desenvolvimento da célula constituem um processo contínuo e dinâmico, atendendo as necessidades do organismo vegetal nos diferentes estádios de desenvolvimento. Neste aspecto, alguns polissacarídeos são preferencialmente sintetizados em detrimento de outros, de maneira a contemplar uma função específica na arquitetura da parede celular. Esta abordagem pôde ser observada em caules de *Araucaria angustifolia*. Por isso, uma discussão geral sobre os processos de síntese de polissacarídeos da parede celular primária será apresentada a seguir.

Polissacarídeos não-celulósicos de parede são sintetizados, em sua grande parte, nos dictiossomos do aparato de Golgi. São posteriormente dirigidos e depositados na parede celular através das vesículas especializadas pertencentes ao Golgi, similares a vacúolos (SMITH, 1993; FOSKET, 1994). Experimentos mostram que a síntese pode ocorrer também no retículo endoplasmático (BRETT e WALDRON, 1990), entretanto em menor quantidade.

As glicosiltransferases (sintases) são responsáveis pela adição de monômeros às cadeias pré-formadas, a partir do terminal não-redutor, utilizando como substrato açúcares-nucleosídeos presentes no citoplasma. Uma variedade destes intermediários é produzida, como a UDP-glucose, GDP-manose, UDP-xilose, GDP-fucose entre outros (BUCHANAN, GRUISSEM E JONES, 2000, WULFF, NORAMBUENA e ORELLANA, 2000), a partir da conversão da glucose-1-fosfato e sacarose, aos derivados monossacarídicos específicos, pela ação de

epimerases. Entretanto, os mecanismos de controle que operam na formação da parede incluem não somente sintases, como também hidrolases (glicosidases e endoglicosidases), que atuam de maneira precisa durante o desenvolvimento celular. Esta atividade hidrolítica é especialmente observada durante o amadurecimento de frutos, onde trabalhos comprovam, por exemplo, a intensa degradação de pectinas, pela ação de poligalacturonases, o que resulta no enfraquecimento substancial da adesão célula-célula (WALDRON e BRETT, 1990).

Nas paredes de caule, a ação destas enzimas é evidenciada nas primeiras etapas de desenvolvimento celular, onde ocorre inicialmente a síntese de polímeros mais substituídos, conferindo maior flexibilidade à parede. Por outro lado, nos últimos estádios de desenvolvimento, os componentes da parede tornam-se menos substituídos, permitindo interações moleculares que resultam em maior rigidez da parede celular. Por esta razão as células mais rígidas encontram-se nas porções inferiores do caule, uma vez que necessitam de maior resistência mecânica para suportar o próprio peso e as pressões ambientais, como a ação do vento.

TAKEUCHI e KOMANIME (1980), estudando cultura de células de *Vinca rosea*, demonstraram que a biossíntese de substâncias pécticas foi mais intensa na fase de divisão celular do que na etapa de expansão celular.

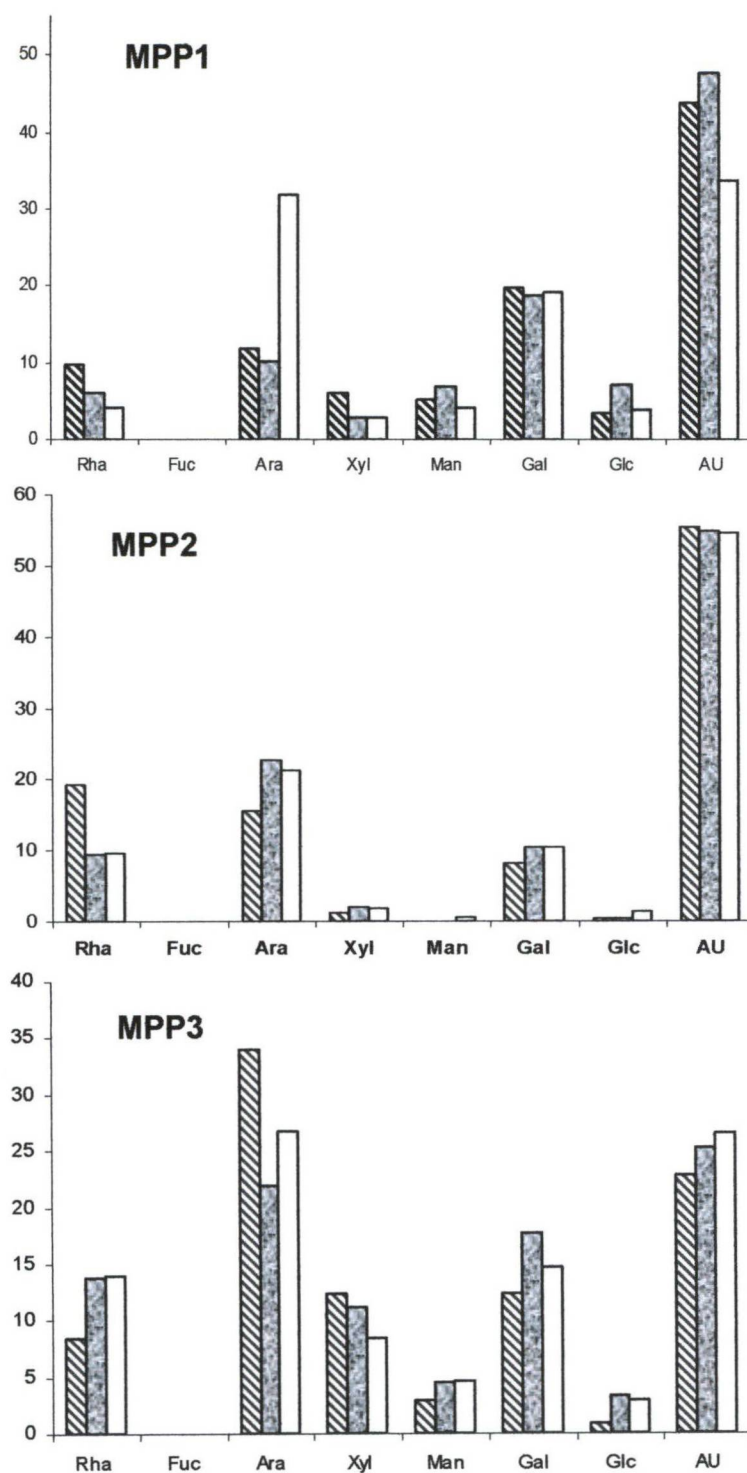
Da mesma maneira, FEMENIA et al. (1999b) investigaram as proporções de derivados metilados de frações brutas obtidas em tecidos jovens e maduros da parede celular de couve-flor, a fim de verificar possíveis diferenças na constituição de polissacarídeos nestes tecidos. Uma vez que arabinogalactanas da parede




celular muitas vezes apresentam-se dispostas lateralmente às moléculas de ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) (BUCHANAN, GRUISSEM e JONES, 2000; WULFF, NORAMBUENA e ORELLANA, 2000), os resultados obtidos por estes autores mostraram que polissacarídeos pécticos substituídos por arabinogalactanas estão presentes em grande quantidade nos tecidos imaturos, acompanhado por um decréscimo significativo destas substituições e do grau de metil-esterificação das pectinas nas células já em fase estacionária.

Já STOLLE-SMITS et al. (1999) citaram que a presença de homogalacturonanas em cultura de células de vagem de feijão é muito mais intensa na fase estacionária de crescimento, resultado da ação enzimática sobre as cadeias laterais de arabinogalactanas.

Recentemente, GÜNTER e OVODOV (2002), avaliando as alterações na parede celular em calos de *Silene vulgaris*, obtiveram arabinogalactanas em grandes quantidades na fase exponencial de crescimento, sendo estas continuamente destruídas durante o processo de expansão celular, apresentando drástico declínio de rendimento.

Para os caules de *A. angustifolia*, a estratégia consistiu dividir os caules em partes que abrigam diferentes etapas de desenvolvimento celular, conforme já abordado nas análises de monitoramento dos teores de parede primária e secundária (item 4.1.1.; pág 47). Esta divisão resultou em três porções distintas, contendo células meristemáticas (porção S); em expansão celular (porção M) e deposição de parede secundária (porção I).



**Figura 34.** Composição monossacarídica das frações extraídas com a) água (fração MPP1), b)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  insolúvel em água (fração MPP2) e c)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solúvel em água (fração MPP3), para as porções superior , média  e inferior  dos caules de *A. angustifolia*.

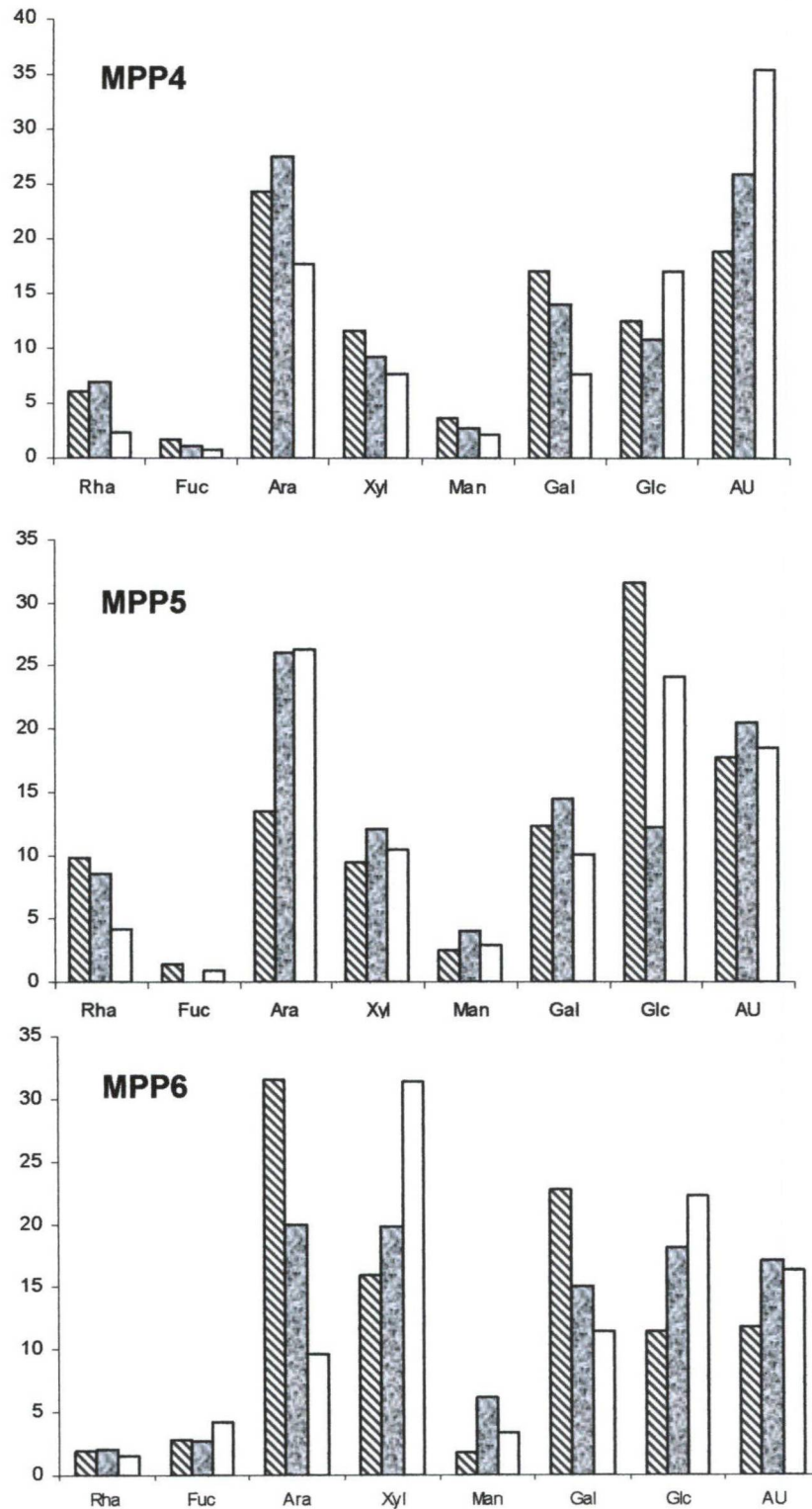



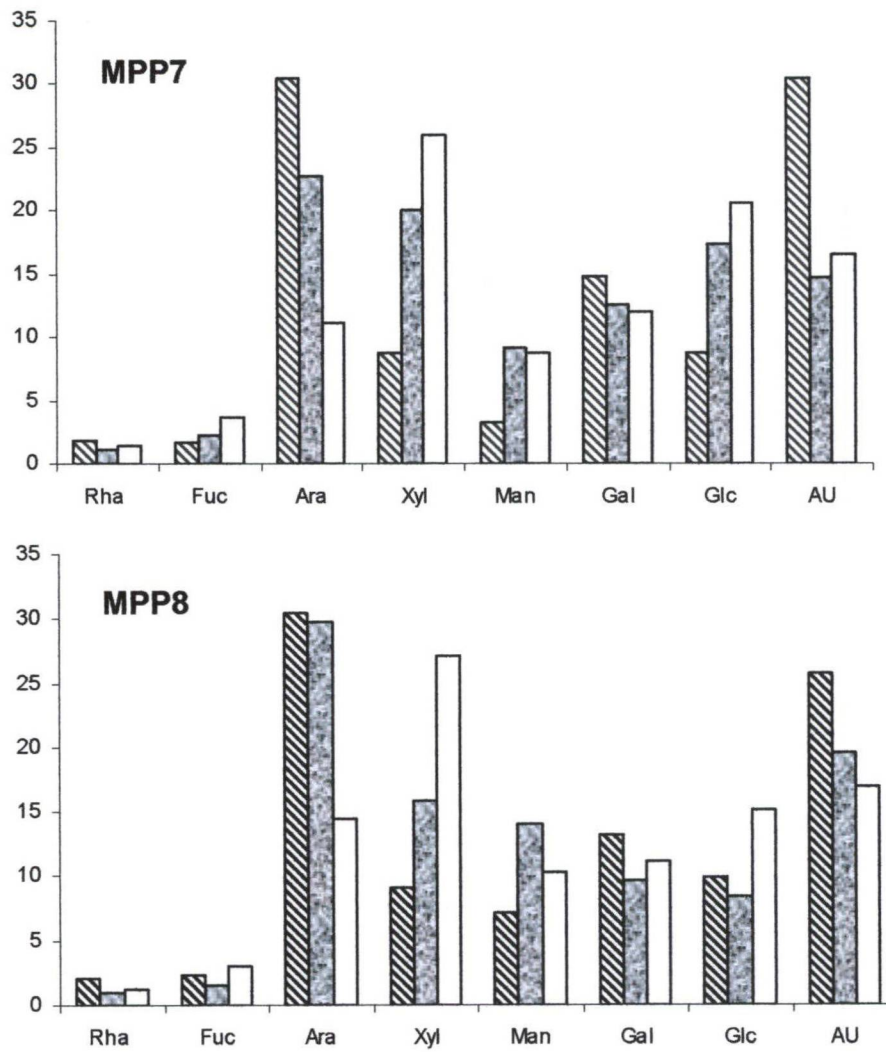



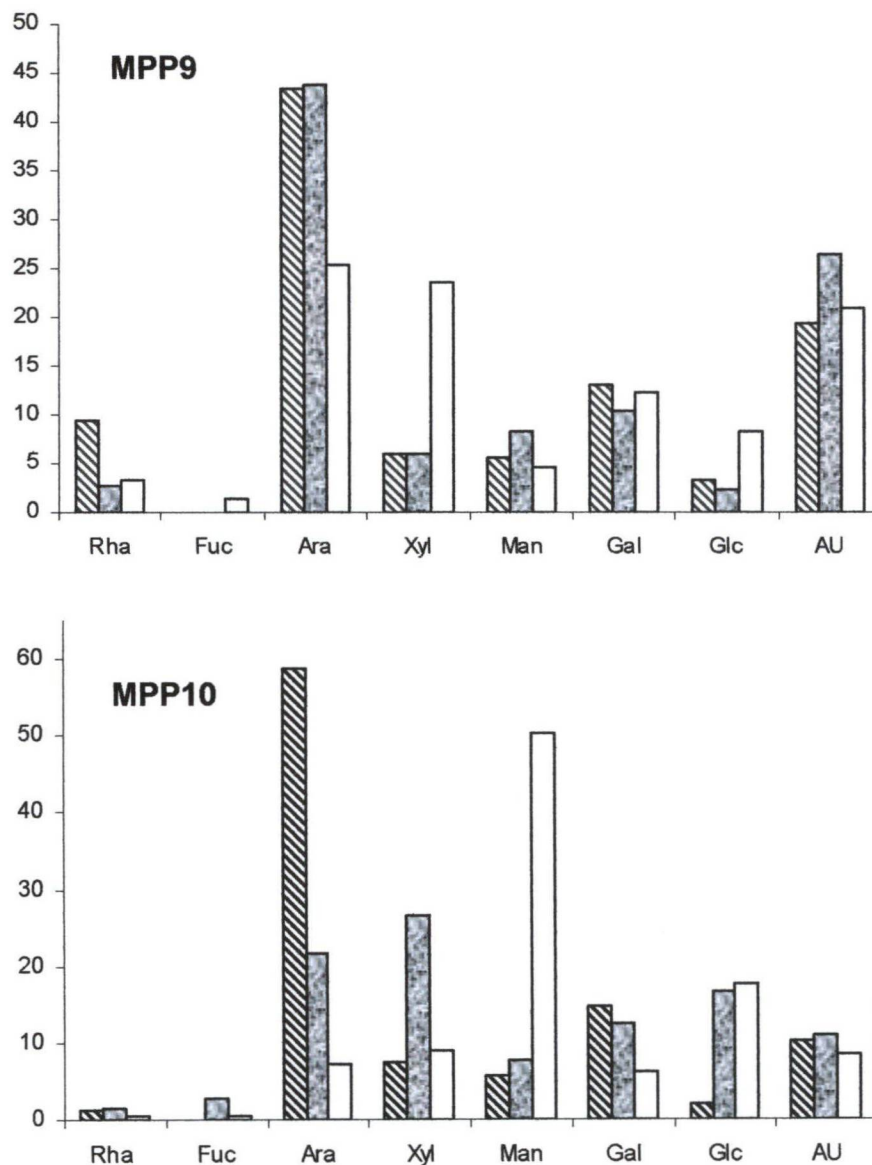





Figura 35. Composição monossacarídica das frações extraídas com a) KOH 0,25 mol/L (MPP4), b) KOH 0,5 mol/L (MPP5) e c) KOH 1,5 mol/L (MPP6), para as porções superior , média  e inferior  dos caules de *A.angustifolia*





**Figura 36.** Composição monossacarídica das frações extraídas com a) KOH 2 mol/L (MPP7) e b) KOH 4 mol/L (MPP8), para as porções superior , média  e inferior  dos caules de *A.angustifolia*.



**Figura 37.** Composição monossacarídica das frações extraídas com a) NaOH 1mol/L (MPP9) e b) NaOH 4 mol/L (MPP10), para as porções superior , média  e inferior  dos caules de *A.angustifolia*.

A partir do isolamento e caracterização de alguns dos polissacarídeos da parede primária e sua identificação por HPSEC, pôde-se estabelecer análises conjuntas das frações brutas obtidas nos diferentes tratamentos de S, M e I.

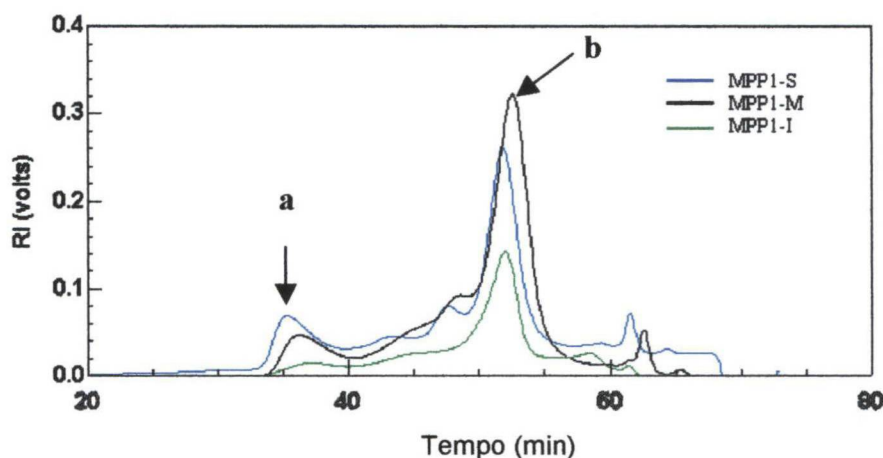
Por esta razão, os resultados já apresentados nas tabelas II, III e IV, abordadas na discussão sobre a estrutura das macromoléculas, fornecem importantes informações à respeito da dinâmica de crescimento dos elementos componentes da parede celular das plântulas de *A. angustifolia*. De maneira a possibilitar uma visualização mais clara da interpretação dos resultados, sob novo enfoque, estes resultados serão novamente apresentados, desta vez sob a forma de gráfico de barras (Figuras 34, 35, 36 e 37). Cada gráfico representa a composição monossacarídica conjunta das frações superior (MPP-S), média (MPP-M) e inferior (MPP-I), para cada tratamento realizado.

A primeira extração com água, das plântulas de *A. angustifolia*, resultou na fração MPP1, constituída basicamente por polissacarídeos pécticos, de acordo com os altos rendimentos em ácidos urônicos (~35-50%), para as porções estudadas (S, M e I). Tratamentos com água geralmente permitem a extração de polissacarídeos mais expostos no ambiente da parede celular e/ou aqueles que estão fracamente associados a outros elementos. Considerando que praticamente toda a fração é constituída por material péctico, é possível sugerir que as pectinas podem estar preenchendo os espaços existentes entre as microfibrilas de celulose, o que explicaria as fracas interações e a facilidade de sua extração.

A baixa ocorrência de ramnose (menos de 10%) nas frações obtidas por extração aquosa, quando comparada aos níveis de ácidos urônicos, reflete os baixos teores de RG-I. Desta maneira, é possível afirmar que grande parte das

pectinas presentes refere-se a homogalacturonanas. A partir dos rendimentos apresentados para esta extração, a porção superior apresenta uma proporção relativa maior (MPP1-S; 2,32 g%) que a porção média (MPP1-M; 1,66 g%). Esta, por sua vez, é constituída por uma proporção relativa maior que a porção inferior (MPP1-I; 0,60 g%). Estes resultados indicam que as homogalacturonanas são ainda metil-esterificadas, explicando a alta solubilidade em água das frações MPP1-S, MPP1-M e MPP1-I. Sabe-se que os altos índices de metil esterificação das pectinas são observados especialmente em células novas e que o desenvolvimento celular é acompanhado pela perda destes grupamentos, pela ação da enzima metilesterase (BUCHANAN, GRUISSEM e JONES 2000; MICHELI, 2001), favorecendo a complexação das pectinas com íons presentes no ambiente da parede, particularmente o cálcio.

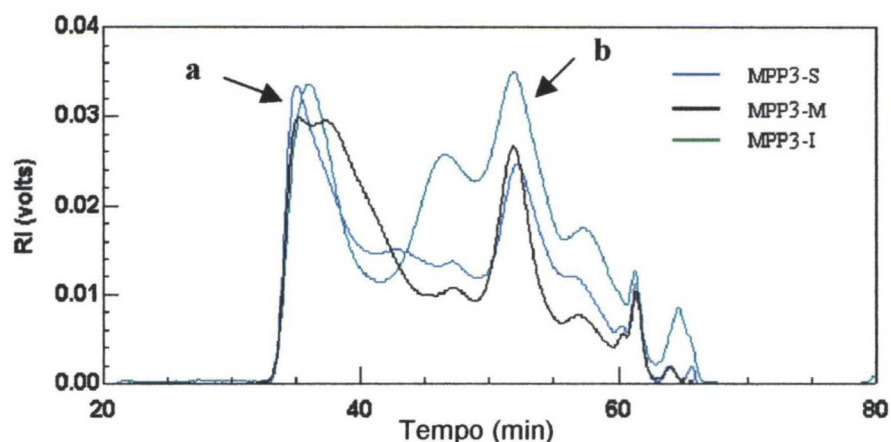
Conforme descrito anteriormente, foram isoladas e caracterizadas por HPSEC tanto as RG-I-arabinogalactanas quanto as homogalacturonanas, a partir da fração MPP1 (Figuras 19 e 21). Os tempos de retenção (TR) apresentados pelo perfil de eluição da Figura 38 correspondem aos TR das moléculas isoladas. Desta maneira, as porções S, M e I extraídas com água (MPP1), apresentam no pico **a**, RG-I-arabinogalactana (TR = 36,2 min.) e no pico **b**, complexo péctico de homogalacturonana e RG-I-galactana (TR = 52,5 min.). A observação do mesmo padrão de distribuição nas três porções analisadas e a presença de **a** em quantidades bem menores que **b** confirmam os resultados obtidos nas composições monossacarídicas.



**Figura 38.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com água (MPP1), para as porções superior (S), média (M) e inferior (I) de plântulas de *A. angustifolia*. a) RGI-arabinogalactana; b) Complexo homogalacturonana e RG-galactana.

Já a extração com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  rendeu duas frações: uma insolúvel e outra solúvel em água. A porção insolúvel apresenta altos teores de ácidos urônicos (~ 60%). Este fato, aliado à sua intensa formação de gel durante o processo de extração e particular insolubilidade em água após a secagem, caracteriza a presença de homogalacturonanas com baixos níveis de metil-esterificação, possivelmente, apresentando-se conjugadas a íons cálcio, formando os pectatos de cálcio. Essa complexação ocorre entre as carboxilas de duas unidades de moléculas de homogalacturonanas diferentes, resultando em uma rede de polímeros pécticos, muitas vezes semelhante a uma “caixa de ovos” (“egg box”) (BUCHANAN, GRUISSEM E JONES, 2000). Neste aspecto, foi observado que os níveis de pectatos de cálcio foram maiores nas células maduras, uma vez que os maiores rendimentos observados na porção inferior dos caules (2,78 g%) são compatíveis com a formação destes complexos pécticos, enquanto a porção superior rendeu apenas 0,78 g% do mesmo polissacarídeo.

Por outro lado, a fração extraída em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solúvel em água (MPP3) apresenta grandes quantidades de RG-I, de acordo com os significativos teores de ramnose (~15 g%). A intensa presença deste polissacarídeo pôde também ser observada pela análise por HPSEC, onde se verificou um aumento da proporção relativa do pico **a** (RG-I-arabinogalactana), quando comparada ao pico **b** (complexo homogalacturonana e RG-I-galactana) (Figura 39). Conforme anteriormente abordado, a presença de RG-I é mais intensa nas células em desenvolvimento. Apesar de a análise por HPSEC apresentar um perfil similar para as três porções do caule (Figura 39), os rendimentos, nesta extração, foram maiores na porção superior do caule (2,87 g%), relativa às células em estádios iniciais de desenvolvimento, enquanto a porção inferior do caule apresenta o menor rendimento (1,13 g%). Estes resultados confirmam que as células em estádios iniciais de desenvolvimento apresentam quantidades maiores de pectinas ramificadas, enquanto as células maduras possuem pectinas menos substituídas.

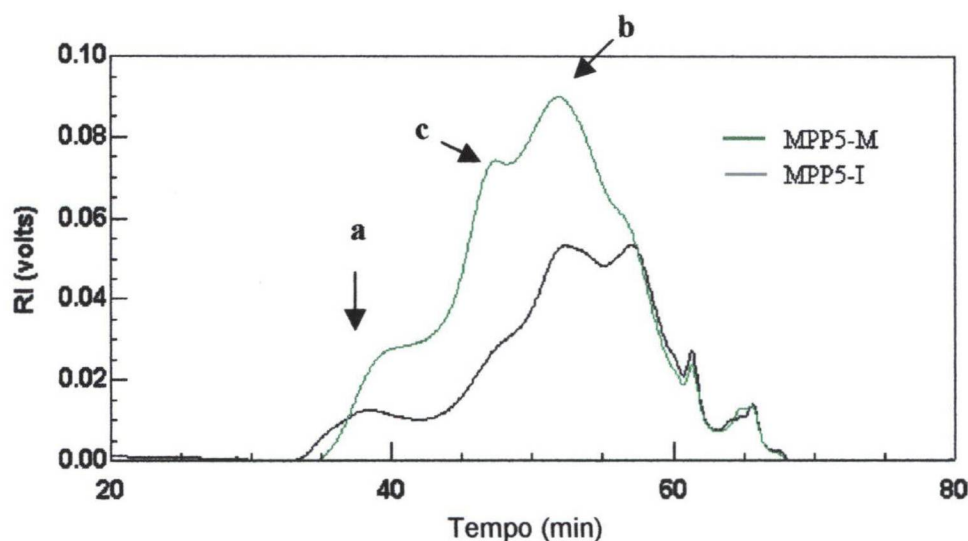


**Figura 39.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 mol/L, solúveis em água (MPP3), nas porções superior (S), média (M) e inferior (I) de plântulas de *A. angustifolia*. a) RGI-arabinogalactana; b) Complexo homogalacturonana e RG-galatana.

Seqüencialmente, extrações alcalinas foram realizadas, rendendo as frações MPP4 a MPP10 (Materiais e Métodos; Fluxograma III; pág. 32). É possível notar que na primeira extração alcalina (KOH 0,25 mol/L), xiloglucana já é extraída da parede celular, uma vez que as frações obtidas (MPP4-S, MPP4-M e MPP4-I) apresentam fucose, xilose e glucose. Ainda nesta fração são observados altos níveis de pectinas substituídas na porção superior do caule (MPP4-S), através dos conteúdos de arabinose e galactose, as quais decaem drasticamente na porção inferior do caule (MPP4-I).

Enquanto a extração com KOH 0,5 mol/L (fração MPP5) apresenta ligeiro aumento nas quantidades de xiloglucanas obtidas (pico c; Figura 40) e ainda

intensa ocorrência de material pécico, a extração com KOH 1,5 mol/L (fração MPP6-I) possibilitou a obtenção de maior quantidade de xiloglucana.

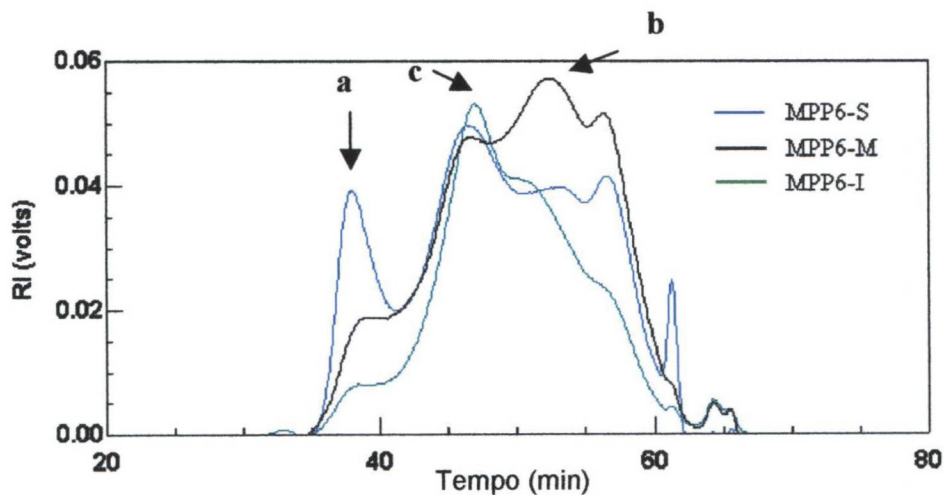


**Figura 40.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com KOH 0,5 mol/L (MPP5), nas porções média (M) e inferior (I) de plântulas de *A. angustifolia*. a) RGI-arabinogalactana; b) Complexo homogalacturonana e RG-galatana; c) Xiloglucana

A xiloglucana, apresenta-se constantemente remodelada em sua estrutura, durante o processo de expansão celular, principalmente pela ação da xiloglucana endotransglicosilase (XET), responsável pela clivagem e reconexão de fragmentos das moléculas de xiloglucana gerados pela atividade de glicosidases e endoglicosidades (BUCHANAN, 2000; COSGROVE, 2001; PAULY et al., 2001; ROSE e BENNETT, 1999). Desta maneira, o polissacarídeo apresenta particular incremento em rendimento durante o desenvolvimento celular. Este incremento pode ser observado na fração MPP6-I, uma vez que nesta se observa um



aumento considerável nos teores de fucose, xilose e glucose, componentes da molécula de xiloglucana, quando comparada com as frações MPP6-M e MPP6-S. Pode-se observar também nesta fração uma nítida queda nos teores de arabinose e galactose na porção inferior, quando comparado à porção superior (MPP6-S), resultado concordante ao observado anteriormente para as substituições das RG-I. Estes resultados são ainda confirmados pela análise das frações obtidas por esta extração, por HPSEC (Figura 41), que mostra claramente a diminuição de homogalacturonanas e galactanas (pico a; TR = 52,0 min.), assim como das RG-I-arabinogalactana nas regiões mais baixas do caule (pico b; TR = 37,2 min.) e a presença de xiloglucanas (pico c; TR = 46,4 min.), identificado pelos tempos de retenção obtidos em sua caracterização estrutural (Figura 30; pág 82).



**Figura 41.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações extraídas com KOH 1,5 mol/L (MPP6), nas porções superior (S), média (M) e inferior (I) de plântulas de *A. angustifolia*. a) RGI-arabinogalactana; b) Complexo homogalacturonana e RG-galatana; c) xiloglucana.

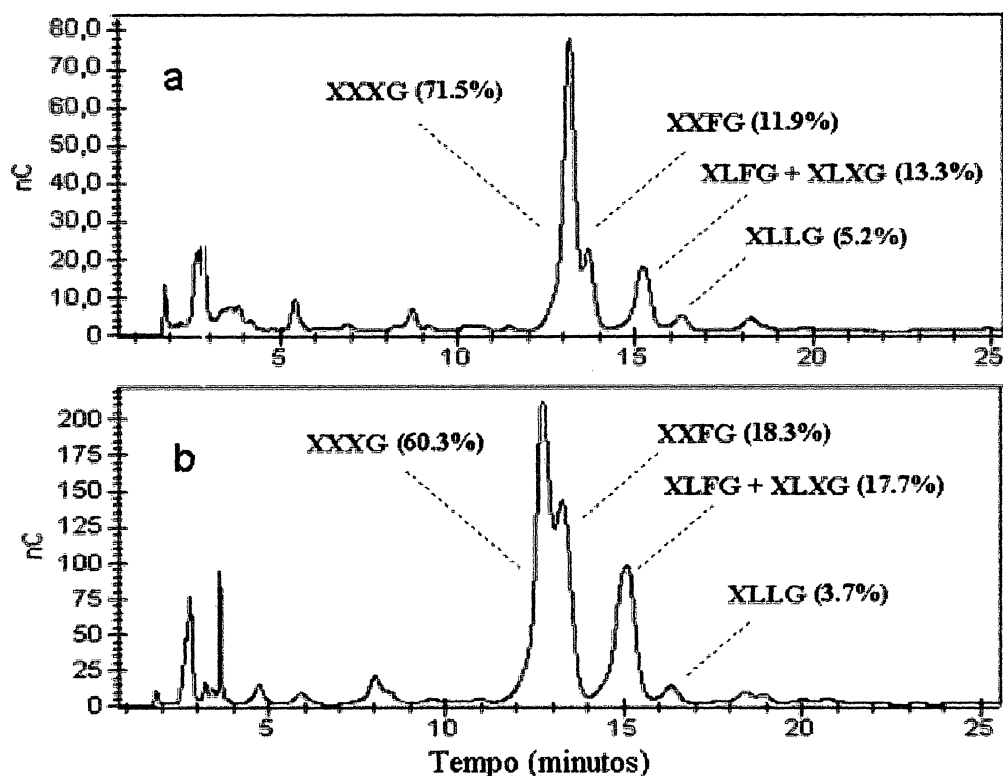
A composição monossacarídica da fração obtida por extração com KOH 2 mol/L (MPP7) reitera o aumento dos teores de xiloglucana e a simultânea diminuição das RG-I-arabinogalactanas. Esta idéia é reforçada pelos rendimentos alcançados, uma vez que a fração MPP7-S, rica em polissacarídeos pécticos, possui um rendimento menor (0,99 g%) que a fração MPP7-I, rica em xiloglucana (2,94 g%). O mesmo pode ser observado para a fração MPP-8, obtida por extração com KOH 4 mol/L. A fração MPP8-S apresenta um rendimento de 0,72 g%, enquanto a fração MPP8-I resultou em 3,83 g%.

A xiloglucana é obtida a partir de extrações alcalinas (KOH 1 mol/L e 4 mol/L) (EDELMAN e FRY, 1992; ROSE e BENNETT, 1999), representando um forte indício de que estas se apresentam intensamente associadas a moléculas de celulose através de pontes de hidrogênio. A mesma observação foi encontrada em *A. angustifolia*, uma vez que as extrações de KOH 0,5 mol/L a 4 mol/L permitiram a extração crescente de xiloglucana. Também é importante observar que a presença de polissacarídeos ácidos em todas as extrações alcalinas sugere que parte das pectinas está fortemente associada a outros componentes da parede celular. FEMENIA et al. (1999a) citam, por exemplo, a existência de associações xiloglucana-xilanas-pectinas, em complexos ligados covalentemente, bem como em parede celular de células cultivadas de angiospermas, onde foram encontradas evidências de ligações covalentes entre xiloglucanas e pectinas (THOMPSON e FRY, 2000).

Outra alternativa que contribui para a avaliação do desenvolvimento da parede celular é o estudo de oligossacarídeos de xiloglucana, a partir de frações obtidas a

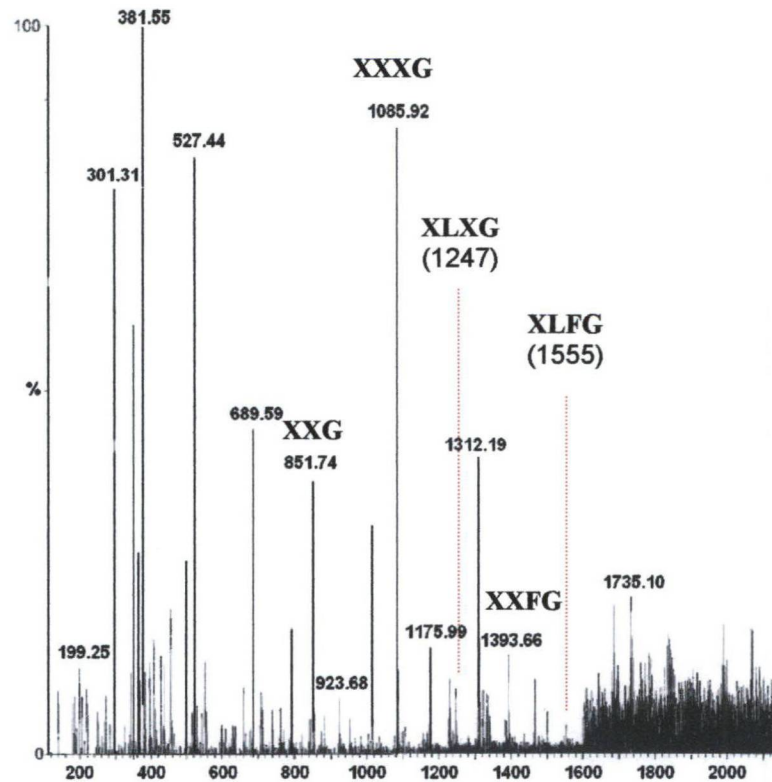
diferentes alturas do caule de plântulas de *A. angustifolia*. Assim, foi realizada a determinação da distribuição de oligossacarídeos, obtidos por hidrólise enzimática, em duas frações de xiloglucanas, pertencentes a diferentes estádios de desenvolvimento celular. As frações MPP6-I[H<sub>2</sub>O] (células maduras) e MPP6-S[H<sub>2</sub>O] (células imaturas), xiloglucanas obtidas a partir de extração com KOH 1,5 mol/L, produziram os perfis de eluição apresentados na Figura 42, cujos oligossacarídeos foram caracterizados de acordo com DESVEAUX et al., 1998 e LEROUXEL et al., 2002.

Pode-se observar que o padrão de distribuição dos oligossacarídeos é similar para as duas frações, entretanto uma importante variação nas quantidades foi observada. Ambas as frações apresentaram o heptassacarídeo XXXG como principal constituinte. No entanto, por outros blocos como o octassacarídeo XLXG, os nonassacarídeos XXFG e XLLG e o decassacarídeo XLFG, foram observados. A presença de alguns dos oligossacarídeos citados acima foi confirmada pela análise de fragmentação por ESI-MS (electrospray) da fração MPP6-I[H<sub>2</sub>O], produzindo fragmentos massa específicos. A fragmentação apresentou um pico principal de massa 1085,72, modo positivo (Na<sup>+</sup>), correspondente ao oligossacarídeo XXXG, o que confirma o resultado obtido na análise por HPLC (Figura 43).



**Figura 42.** Perfil de eluição de oligossacarídeos (HPLC), obtidos por hidrólise enzimática, das frações de xilogucana a) MPP6-S[H<sub>2</sub>O]; b) MPP6-I[H<sub>2</sub>O].

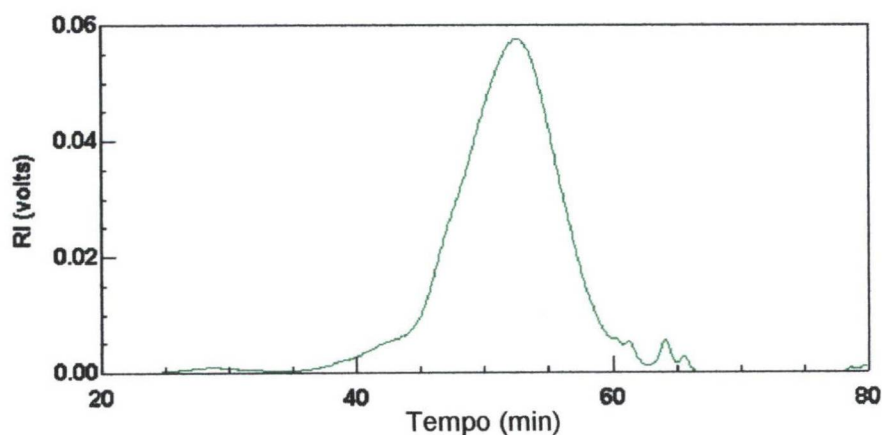
Na análise quantitativa dos oligossacarídeos obtidos por HPLC, é possível observar que a fração MPP6-I[H<sub>2</sub>O] contém 60,3% do oligossacarídeo XXXG, menos que a fração MPP6-S[H<sub>2</sub>O], que possui 71,5% da mesma molécula. Por outro lado, a fração MPP6-I[H<sub>2</sub>O] apresentou um aumento dos teores de outros oligossacarídeos, como o XXFG (18,3%) e a mistura XLFG + XLXG (17,7%), valores maiores ao encontrado para a fração MPP6-S[H<sub>2</sub>O], que apresentou XXFG (11,9%) e a mistura XLFG + XLXG (13,3%). Já o oligossacarídeo XLLG resultou em quantidades similares, rendendo 3,7% para MPP6-I[H<sub>2</sub>O] e 5,2% para MPP6-S[H<sub>2</sub>O].



**Figura 43.** Espectro de fragmentação (modo positivo) dos oligossacarídeos de xiloglucana da fração MPP6-I[H<sub>2</sub>O].

A interação da xiloglucana com a celulose é modulada principalmente por galactose e fucose (LEVY, MACLACHLAN e STAEHELIN, 1997; LIMA e BUCKERIDGE, 2001), uma vez que estes monômeros permitem uma mudança conformacional que leva a uma maior interação molecular. A quantidade de oligossacarídeos constituídos por fucose, observada nas células em desenvolvimento inicial (MPP6-S[H<sub>2</sub>O]), cuja relação XXXG:XXFG (3,3:1) é menor que aquela encontrada para as células em estádios iniciais de desenvolvimento, XXXG:XXFG (6,0:1), representa um importante indício que em gimnospermas a interação xiloglucana-celulose também tem participação essencial de unidades de fucose.

Seqüencialmente às extrações com KOH, os tratamentos com NaOH 1 mol/L e 4 mol/L mostraram-se eficientes na obtenção de altos teores de arabinanas, nas porções superiores dos caules (MPP9-S e MPP10-S), culminando com quase 60% em MPP10-S. Estas possivelmente substituem as cadeias de RG-I, uma vez que este tipo de associação é relatada na literatura (BUCHANAN, GRUISSEM e JONES, 2000). Assim como as arabinogalactanas, as arabinanas apresentaram um intenso declínio de rendimento nas porções inferiores do caule (MPP9-I e MPP10-I). Estas frações apresentam total insolubilidade em água, característico de arabinanas lineares (ZAWADZKI-BAGGIO et al., 1992). Simultaneamente ao declínio de pectinas substituídas nas porções inferiores dos caules, foi observado notável aumento nos teores de manose nas porções inferiores dos caules, principalmente da fração MPP10-I, apresentando um perfil praticamente homogêneo (Figura 44). A purificação desta fração por troca iônica rendeu a fração MPP10-I[H<sub>2</sub>O], uma GGM anteriormente apresentada na Figura 24; pág. 71.

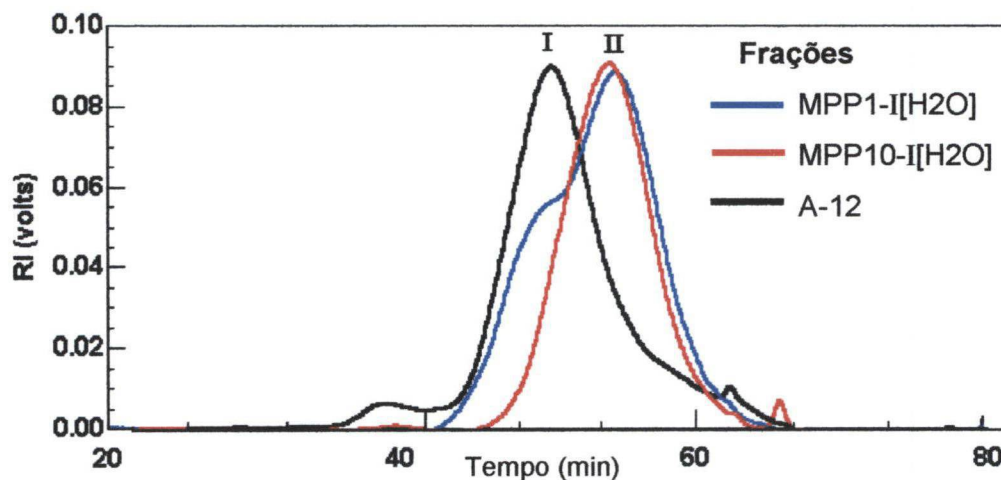


**Figura 44.** Perfil de eluição (HPSEC) da fração extraída com NaOH 4 mol/L (MPP10-I) da porção inferior do caule (I) de plântulas de *A. angustifolia*.

Conforme anteriormente descrito, o processo de expansão das células vegetais é seguido pela formação da parede secundária, o que foi confirmado pelo expressivo aumento nos teores de manose na fração MPP10-I, refletindo a síntese de GGM de parede secundária. Esta GGM foi purificada por troca iônica, resultando na fração MPP10-I[H<sub>2</sub>O] (Figura 22; pág 82), de estrutura química muito similar àquela GGM isolada do xilema (fração A-12) (Figura 32; pág. 84). Provavelmente, MPP10-I[H<sub>2</sub>O] pertence à parede secundária, uma vez que se trata de um material retirado da porção inferior dos caules, contendo células maduras. Entretanto, possui uma massa molecular menor e maior solubilidade em água do que A-12. Sua maior solubilidade pode ser justificada pelo maior teor de galactose, bem como pela menor massa molecular, sugerindo que a biossíntese de GGM requer um grau mais acentuado de galactosilação no início do processo de desenvolvimento da parede secundária.

Outra GGM, obtida da porção inferior das plântulas (fração MPP1-I[H<sub>2</sub>O]), a partir de extração aquosa (Figura 17; pág. 59), foi caracterizada como sendo similar àquelas já caracterizadas (MPP10-I[H<sub>2</sub>O] e A-12), entretanto apresenta grupamentos O-acetil, conforme identificado por RMN (Figura 18, pág. 60). Quando analisada por HPSEC, mostrou-se heterogênea, apresentando dois picos (I e II). Conforme mostrado na Figura 45, o pico II é coincidente com a fração extraída com NaOH 4 mol/L, MPP10-I[H<sub>2</sub>O], obtida também de plântulas. Já o pico I, cuja massa molecular é maior, coincide com a fração A-12. Analisando estes resultados em conjunto, é possível sugerir que no início da síntese de parede secundária, as GGM possuem menor massa molecular e um grau de

galactosilação maior. À medida que as células se desenvolvem, modificações na estrutura das GGM também ocorrem, como o aumento da massa molecular e diminuição do grau de galactosilação.

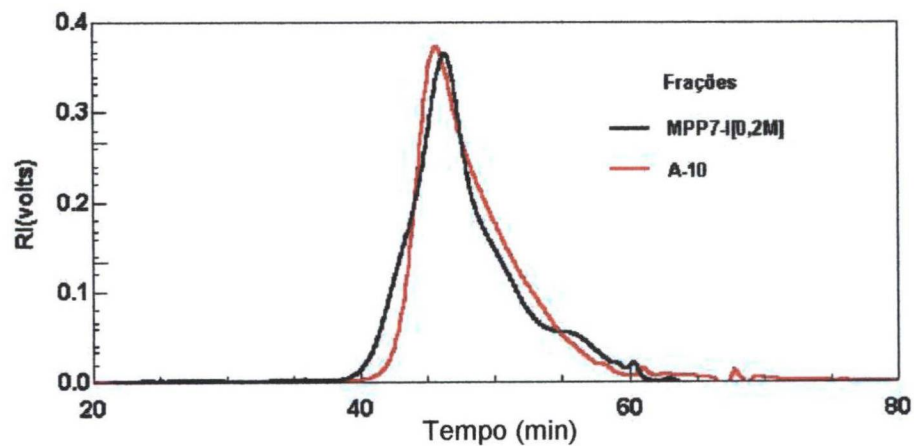


**Figura 45.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações de GGM purificadas, a partir de extração com água (fração MPP1-I[H<sub>2</sub>O]), NaOH 4 mol/L (fração MPP10-I[H<sub>2</sub>O]) em plântulas e com NaOH 4 mol/L (fração A-12) em xilema de *A. angustifolia*.

A investigação sobre a ocorrência e distribuição dos grupamentos O-acetil nas GGM, no decorrer do desenvolvimento das plântulas até o xilema de *A. angustifolia*, exigiria milhares de mudas, considerando que para os estádios iniciais de desenvolvimento seriam utilizados apenas os segmentos de 0-1cm superiores de cada muda, os quais após a extração aquosa renderiam somente cerca de 5 g% corresponde a GGM acetilada e que a fração ainda deveria passar pelo processo de purificação.



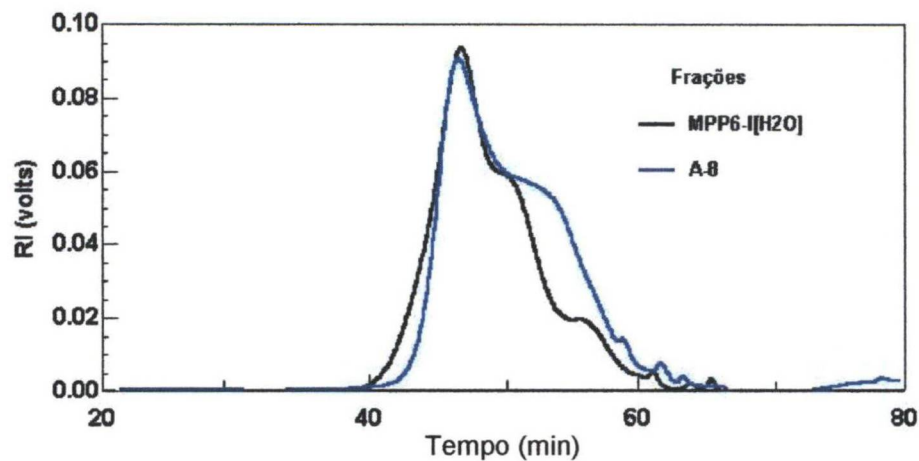
Assim como as GGM, as AGX são outra classe de polissacarídeos existentes na parede secundária de gimnospermas. Conforme apresentado nas análises de polissacarídeos de xilema, as AGX são preferencialmente extraídas com KOH e constituem-se em dois tipos, identificados com os picos I e II (Figura 26; pág. 78), que se diferenciam apenas pelas massas moleculares. A presença de AGX também foi descrita anteriormente, neste trabalho, nas plântulas de *A. angustifolia* (fração MPP7-I[0,2M]), obtida a partir de extração com KOH 2 mol/L e fracionamento em coluna de troca iônica (NaCl 0,2 mol/L). Esta fração isolada apresenta um tempo de retenção (TR = 46,92 min.) muito similar àquela encontrado para a AGX de pico I (TR = 46,45 min.), referente à fração A-10, obtida por extração com KOH 4 mol/L, conforme apresentado na Figura 46.



**Figura 46.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações MPP7-I [0,2M] (plântulas) e A-10 (xilema) de *A. angustifolia*.

A ausência do pico II, de massa molecular mais baixa, poderia estar agregada nas frações obtidas com menores concentrações de KOH, uma vez que

estas AGX de xilema foram obtidas principalmente com KOH 0,25 mol/L e KOH 0,5 mol/L. De fato, a mesma porção dos caules, quando submetida a uma extração com 1,5 mol/L e fracionada por troca iônica com NaCl 0,2 mol/L (fração MPP6-I[H<sub>2</sub>O]), apresentou um novo pico, de massa molecular mais baixa, na análise por HPSEC (Figura 47), apesar de apresentar uma composição monossacarídica muito similar a fração MPP6-I[H<sub>2</sub>O]. É importante considerar, entretanto, que as AGX obtidas das frações MPP5-I (KOH 0,5 mol/L) e MPP4-I (KOH 0,25 mol/L) apresentam teores de xilose e arabinose, somadas, em torno de 15%, enquanto a fração MPP6-I e MPP7-I apresentam cerca de 50 % destes monossacarídeos. Uma vez comprovada a menor incidência de AGX de baixa massa molecular (pico II) nas porções inferiores das plântulas de *A. angustifolia* e considerando que este material possivelmente ainda não se encontra totalmente lignificado, aqueles resultados indicativos da existência de interações moleculares entre AGX (pico II) de xilema com a lignina, apresentados para *P. selowii* (Figura 29; pág 84), podem ser reforçados. Possivelmente, a AGX (pico II) é biossintetizada em estádios mais avançados de crescimento das plântulas, onde a necessidade de obter maior reforço estrutural vegetal requer elevada produção de sua associada, a lignina.



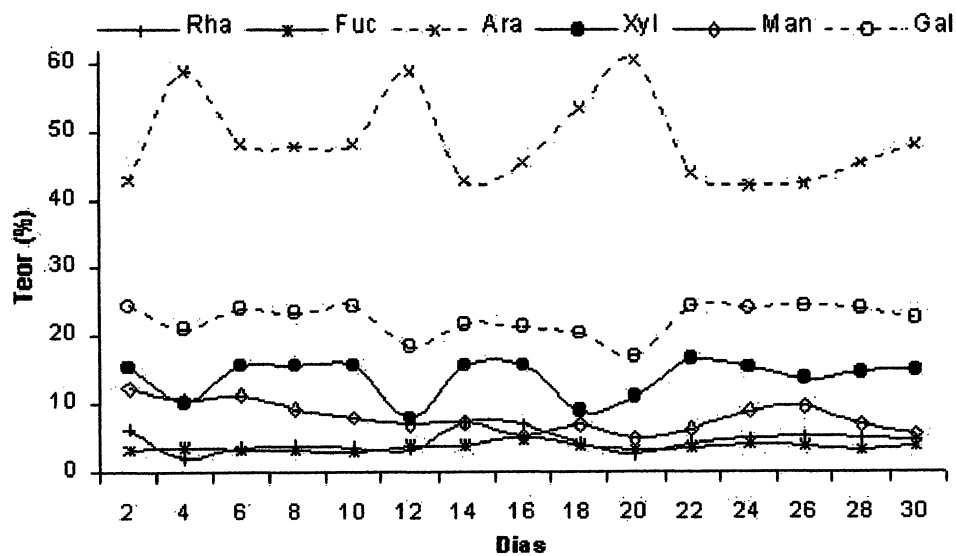
**Figura 47.** Perfil de eluição (HPSEC) das frações MPP6-I[0,2M] (plântulas) e A-8 (xilema) de *A. angustifolia*.

#### **4.4. Análise da composição monossacarídica da parede celular de células *Araucaria angustifolia* crescidas em suspensão**

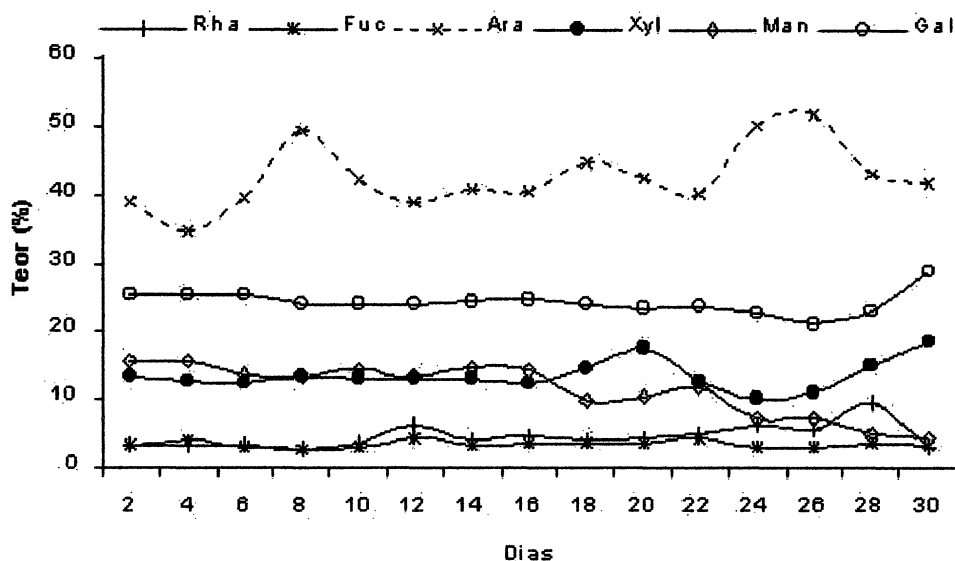
Estudos preliminares envolvendo células cultivadas de *A. angustifolia* também foram realizados, a fim de descrever uma possível variação no conteúdo dos monossacarídeos constituintes (após hidrólise ácida total), durante um intervalo de 30 dias após o início do cultivo, refletindo as alterações ocorridas na constituição dos polissacarídeos presentes na parede celular durante esse período. Dois experimentos foram realizados simultaneamente, variando a presença e ausência da de PGR (reguladores de crescimento vegetal). Um dos hormônios de crescimento, o 2,4-D, induz uma rápida resposta em crescimento, explicado em parte pela indução da acidificação causada no ambiente da parede celular, permitindo o afrouxamento das interações entre os elementos da parede e a ação de enzimas responsáveis pela síntese de polímeros (FRY, 1989). Os

resultados da Figura 48 indicam que, no tratamento ausente de 2,4D, a arabinose é o monossacarídeo mais abundante (~55%), apresentando intensas flutuações em sua composição durante os dias analisados.

Já no tratamento que utiliza o 2,4D (Figura 49), o conteúdo de arabinose é um pouco menor (~45%) e apresenta menor variabilidade em sua composição. Os altos percentuais de arabinose, em ambos os tratamentos, são indicativos da presença majoritária de pectinas (arabinogalactanas de RG-I) em células cultivadas, uma vez que o conteúdo de galactose também é significativo (~25%).



**Figura 48.** Composição monossacarídica da parede celular de células de *A. angustifolia* cultivadas em meio sem 2,4-D.

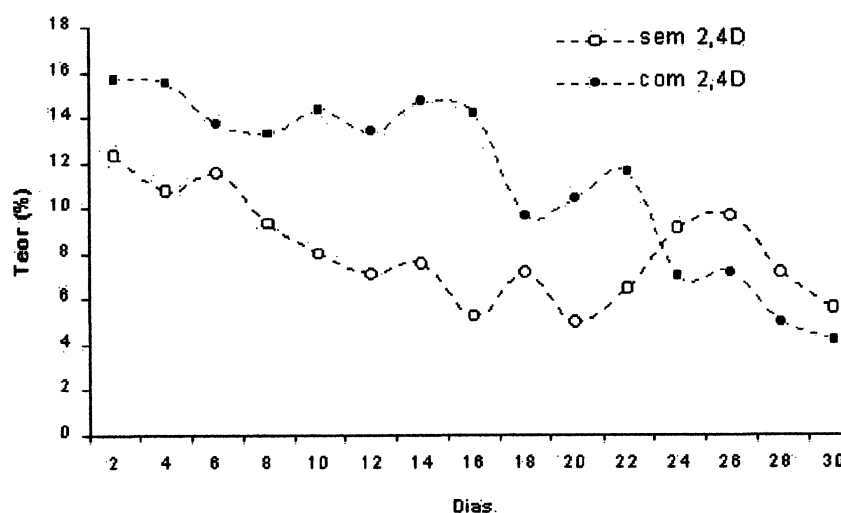


**Figura 49.** Composição monossacarídica da parede celular de células de *A. angustifolia* cultivadas em meio com 2,4-D.

Conforme discutido para a dinâmica de crescimento de células de plântulas de *A. angustifolia*, ocorre uma queda de rendimento de pectinas durante o desenvolvimento da parede celular, inclusive das arabinogalactanas. Observou-se, no entanto, nos experimentos com células cultivadas, que não houve variações significativas no conteúdo de arabinose e galactose.

Apesar de uma parte da massa de calos apresentar células maduras, onde parte das células não apresentam mais a capacidade de expansão, deve-se considerar, entretanto, que as células jovens presentes nos calos foram capazes de produzir novas células durante os 30 dias de cultivo, culminando no trigésimo dia com a maior quantidade de células, uma vez que a curva de crescimento para células cultivadas de *A. angustifolia* atinge a máximo em torno de 30 dias (ASTARITA e GUERRA, 2000), enquanto que nos primeiros dias de experimento (inóculo inicial), estaria agregada a maior quantidade de células maduras.

Uma importante variação foi observada com o conteúdo de manose (Figura 50), componente da parede secundária (GGM). Esta variação foi observada nos dois tratamentos (com e sem 2,4D), constituindo um percentual máximo de manose nos quatro primeiros dias de cultivo (15%), decaindo para cerca de 4% ao trigésimo dia. Provavelmente, esta queda de rendimento é reflexo da produção de novas células, ausentes de parede secundária. É importante observar que o conteúdo máximo de manose (~15%), obtido por hidrólise total do material de parede, corresponde a menos da metade do conteúdo de manose observado na parede celular de xilema de *A. angustifolia* (36,0%) (Tabela XI; pág. 77), submetido ao mesmo tratamento hidrolítico. Este resultado reforça as diferenças observadas na constituição dos elementos da parede celular de células cultivadas daquelas naturalmente existentes no vegetal.



**Figura 50.** Composição de manose em células de caule de *A. angustifolia* cultivadas em meio na ausência e presença de 2,4D.

#### 4.5. Considerações finais

As espécies vegetais, tais como se encontram atualmente em seus aspectos morfológicos, fisiológicos e anatômicos, são reflexo da resposta que cada uma desenvolveu ao ambiente, no decorrer da evolução. A parede celular foi um dos alvos desta adequação ao ambiente, uma vez que se pode verificar sensível diferença na composição de seus elementos constituintes, para os diferentes grupos vegetais. A composição da parede celular primária de espécies dicotiledôneas, cujos elementos da parede primária são classificados como Tipo I apresentam principalmente xiloglucanas e grande quantidade de material péctico, possuindo clara distinção daquelas espécies pertencentes às monocotiledôneas gramíneas (Poales), cujos elementos da parede são classificados como Tipo II, sendo constituída majoritariamente de arabinoxilanas ácidas e glucanas de cadeia mista. Entretanto, a parede primária das angiospermas é similar às espécies pertencentes ao grupo das monocotiledôneas não-comelinóides, também do Tipo I. Notável diferença também pode ser verificada com relação às hemiceluloses da parede secundária de angiospermas, compostas basicamente por xilanas ácidas, com aquelas de gimnospermas, que apresentam principalmente galactoglucomanas e arabinoxilanas ácidas.

A análise dos polissacarídeos parede celular de caule da gimnosperma *A. angustifolia* e as modificações ocorridas no ambiente celular foram abordadas neste trabalho. Os resultados aqui obtidos, a partir da análise dos aspectos estruturais, o entendimento sobre a dinâmica de formação da parede primária e secundária e as interações existentes entre os diferentes elementos da parede

contribuem com a elaboração de um modelo de arquitetura da parede celular em gimnospermas. Neste aspecto, observou-se que a parede primária de *A. angustifolia* é composta por quantidades significativas de xiloglucana, cuja estrutura molecular é similar àquelas encontradas em angiospermas. Polissacarídeos pécticos também estão presentes na parede primária, principalmente as homogalacturonanas e menores quantidades de ramnogalacturonanas. Provavelmente, parte destas pectinas apresenta-se mais exposta ao ambiente da parede celular e/ou localiza-se inserida nos espaços existentes entre as microfibrilas de celulose, apresentando interações fracas com outros elementos da parede. Diferentemente, outra porção de pectinas é fortemente conectada aos demais elementos da parede.

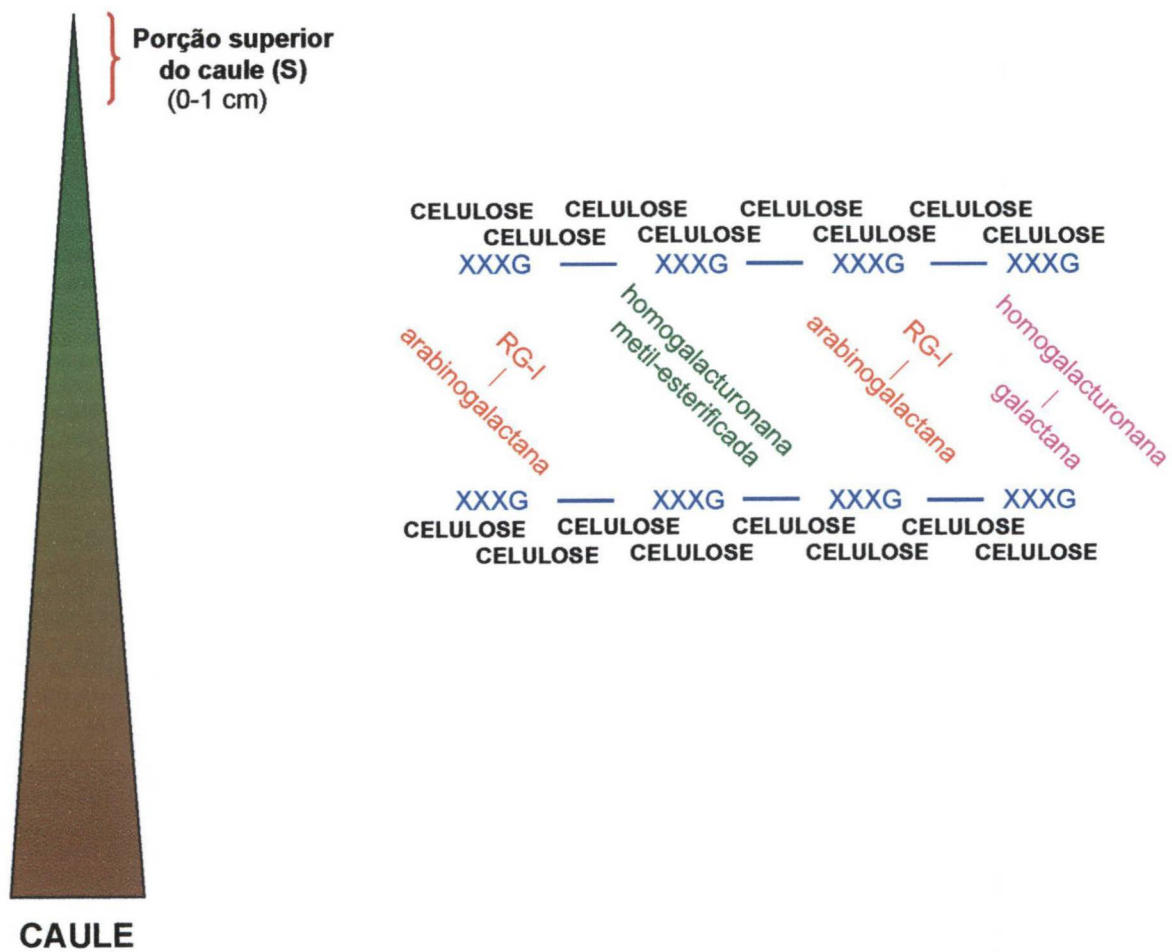
Apesar das arabinoxilanas e galactoglucomananas terem sido também isoladas e caracterizadas a partir das plântulas de *A. angustifolia*, os resultados indicaram que estas pertencem à parede secundária, uma vez que se verificou uma produção crescente destes polissacarídeos durante o desenvolvimento celular. Com o decorrer do tempo, também foi verificada uma produção crescente de xiloglucana, uma sensível diminuição das ramificações das pectinas e simultânea a redução das unidades metil-esterificadas.

As evidências apresentadas para o conjunto dos resultados deste trabalho permitem concluir que a parede celular primária de *A. angustifolia*, uma gimnosperma nativa do sul do Brasil apresenta características típicas às paredes primárias do Tipo I, considerando a semelhança não somente na composição e estrutura dos polissacarídeos, como também pela similaridade observada durante



as modificações ocorridas nos mesmos polissacarídeos durante o desenvolvimento celular.

Considerando os resultados obtidos para os polissacarídeos de *Araucaria angustifolia*, *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus selowii*, uma síntese esquemática da parede celular de gimnospermas foi elaborada, conforme apresentado nas Figuras 51, 52 e 53.



**Figura 51.** Modelo representativo da parede de células em diferenciação (porção superior) de gimnosperma.

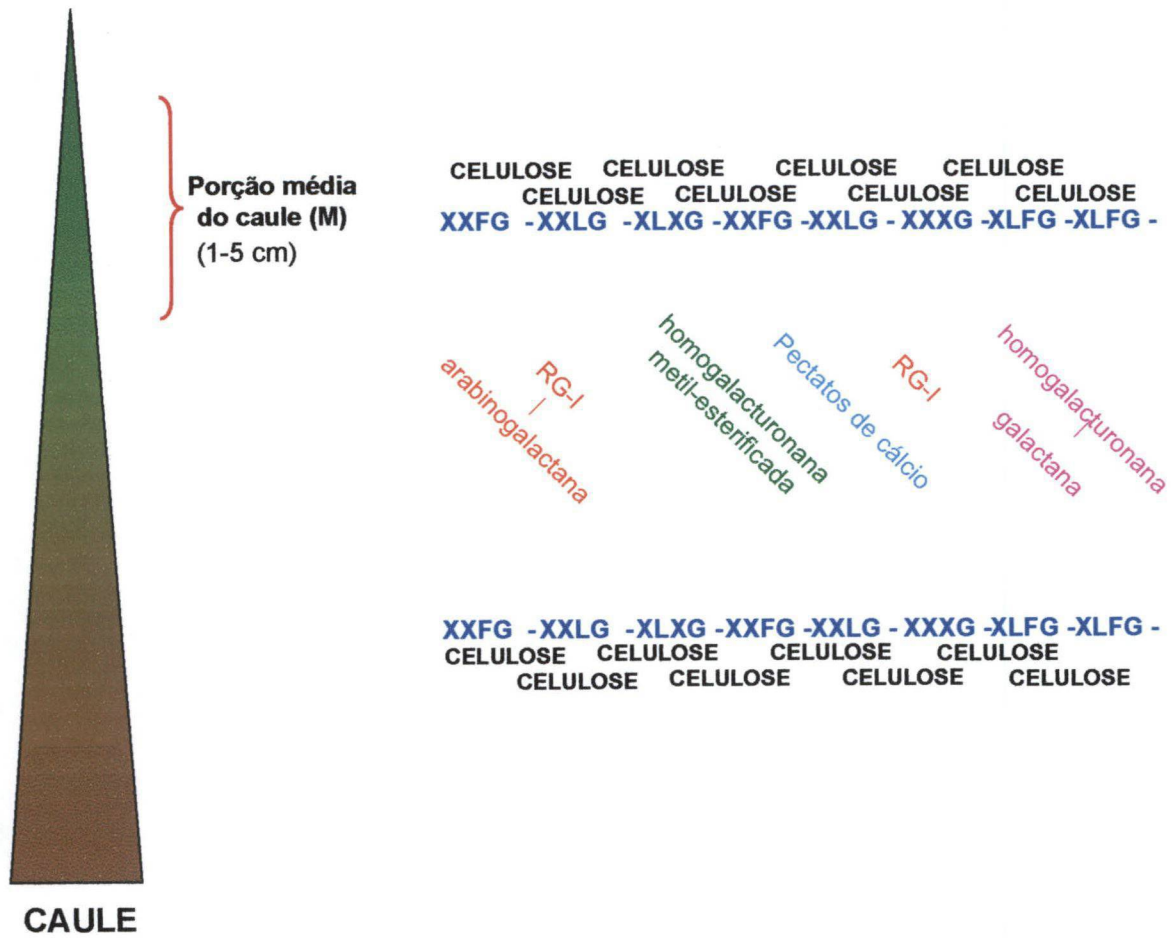


Figura 52. Modelo representativo da parede de células em expansão (porção média do caule) de gimnosperma.

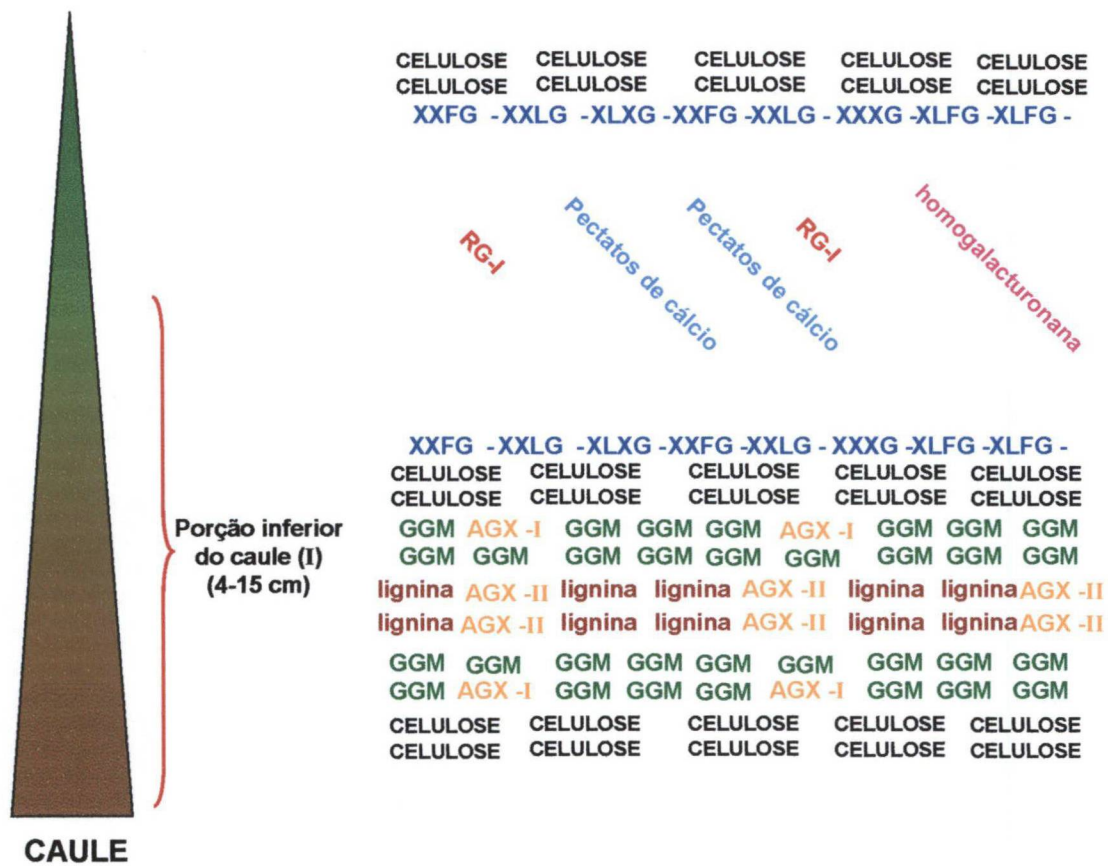


Figura 53. Modelo representativo da parede de células maduras (porção superior do caule) de gimnosperma.

## **5. Referências Bibliográficas**

- ABDEL-HAFIZ, S. A. Accelerated oxidation of maize starch using the sodium chlorite/thiourea system. **Polym. Deg. Stab.**, v. 47, p., 275-281, 1995.
- ACEBES, J. L.; MORAL, R.; ZARRA, I. Purification and structure of xyloglucan in pine hypocotyls. **Phytochemistry**, v. 33 (6), p. 1343-1345, 1993.
- ADAMS, G. A. Lignin determination. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 185-187, 1965a.
- ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 269-276, 1965b.
- ALBERSHEIM, P. Concerning the structure and the biosynthesis of the primary cell walls of plants. **Int. Rev. Biochem.**, v.16, p. 127-150, 1978.
- ANDREW, I. G.; LITTLE, J. W. L. A xyloglucan in etiolated seedlings of *Pinus radiata*. **Phytochemistry**, v. 46 (2), p. 203-207, 1997.
- ANDREWARTHA, K.A.; PHILLIPS, D.R.; STONE, B.A. Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans. **Carbohydr. Res.**, v. 77, p. 191-204, 1979.
- ASPINALL, G. O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 14, p. 429-468, 1959.

ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v. 36, p. 194-200, 2000.

ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 10(2), p. 113-118, 1998.

AZUMA, J. I.; TAKAHASHI, N.; KOSHIJIMA, T. Isolation and characterization of lignin-carbohydrate complex from the milled-wood lignin fraction of *Pinus densiflora* Sieb et Zucc. **Carbohydr. Res.**, v. 93, p. 91-104, 1981.

BAMBER, R. K.; SUMMERVILLE, R.; Gregory, J. Unusual cells in the mesophyll zone of leaves of *Araucaria*. **Aust. J. Bot.**, v. 26, p. 177-187, 1978.

BAUER, W. D.; TALMADGE, K.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant-cell walls. 1. Macromolecular components of walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of pectic polysaccharides. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 174-187, 1973.

BAZUS, A.; RIGAL, L.; GASET, A.; FONTAINE, T.; WIERUSZESKI, J.M.; FOURNET, B. Isolation and characterisation of hemicelluloses from sunflower hulls. **Carbohydr. Res.**, v. 243, p. 323-332, 1993.

- BIKOVA, T.; TREIMANIS, A. Solubility and molecular weight of hemicelluloses from *Alnus incana* and *Alnus glutinosa*. Effect of tree age. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p. 347-353, 2002.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, v. 54, p. 484-489, 1973.
- BOCHICCHIO, R. Hemiceluloses do xilema do gênero *Podocarpus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.
- BOCHICCHIO, R., GANTER J. L. M. S.; REICHER R. Isolation of hemicelluloses from the xylem of *Podocarpus lambertii*: delignification process. **Proc. Int. Symp. Nat. Pol. Comp.**, p. 189-193, 2000.
- BOCHICCHIO, R., GANTER J. L. M. S.; REICHER R. Arabinoxylans of woody tissues from *Podocarpus lambertii* and *Podocarpus selowii*. **Proc. Int. Symp. Nat. Pol. Comp.**, 2002.
- BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. Are hemicelluloses from *Podocarpus lambertii* typical of gymnosperms? **Carbohydr. Polymers**, v. 53, p. 154-164, 2003.
- BOCHICCHIO, R.; SAIS, H. M.; BUSATO, A. P.; REICHER, F. Polysaccharides of the leaves cell wall from commelinoid monocolydonea *Cladium mariscus* (L.) Pohl., manuscrito em preparação.

BRETT, C; WALDRON, K. In: **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls.**

Unwin Hyman Ltda., p.193, 1990.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. The cell wall. In: **Biochemistry and Molecular Biology.** American Society of Plant Physiologists, p. 52, 2000.

BURGER, R.; RICHTER, H. **Anatomia da Madeira.** Ed. FUPEF, Curitiba, 1992.

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

CAPEK, P., KUBACKOVA, M., ALFÖLDI, J., BILISICS, L., LISKOVA, D.; KAKONIOVÁ D. Galactoglucomannan from the secondary cell wall of *Picea abies* L. Karst. N. **Carbohydr. Res.**, 329, 635-645, 2000.

CARNACHAN, S. M.; HARRIS, P. J.; Polysaccharide compositions of primary cell walls of the palms *Phoenix canariensis* and *Rhopalostylis sapida*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 699-708, 2000.

CARPITA, N. C.; WHITTERN; D. A highly substituted glucuronoarabinoxylan from developing maize coleoptiles. **Carbohydr. Res.**, v. 146, p. 129-140, 1986.



CARPITA, N.; 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(1), p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M.; GRIFFING, L. R. The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier. **Plant Cell.**, v. 8(9), p. 1451-1463, 1996.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras. Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira.** EMBRAPA-SPI, Colombo, Paraná, 1994.

CHAMBAT, G.; BARNOUD, F.; JOSELEAU, J. P. Structure of the primary cell walls of suspension-cultured *Rosa glauca* cells. 1. Polysaccharides associated with cellulose. **Plant Physiol.**, v.74, p.687-693, 1984.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COIMBRA, M.A.; WALDRON, K.W.; SELVENDRAN, R. R. Isolation and characterisation of cell wall polymers from olive pulp (*Olea europaea l*) **Carbohydr. Res.**, v. 252, p. 245-262, 1994.

COSGROVE, D. J. Biophysical control of plant cell growth. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.37, p.377-405, 1986.

COSGROVE, D. J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38 (1/2), p. 109-124, 2000.

COSGROVE, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. **Plant Physiol.**, v.125, p. 131-134, 2001.

CROON, I.; LINDBERG, B. O. Studies on glucomannan from norwegian spruce. **Acta. Chem. Scand.**, v. 12, p. 453-456, 1958.

DARVILL, A. G.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. 8. New pectic polysaccharide. **Plant Physiol.**, v. 62, p. 418-422, 1978.

DARVILL, A. G.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P.; DELMER, D. P. In: **The Biochemistry of Plants**, ed. N.E. Tolbert, p. 91-162, Academic, New York, 1980.

DAS, N. N.; DAS, S. C.; DUTT, A. S.; ROY, A. Lignin-xylan linkage in jute fiber (*Corchorus capsularis*). **Carbohydr. Res.**, v. 94, p. 73-82, 1981.

DERVILLY-PINEL, G.; THIBAUT, J. F.; SAULNIER, L. Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. **Carbohydr. Res.**, v. 330, p. 365-372, 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.

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.

DU PONT, M.S.; SELVENDRAN, R.R. Hemicellulosic polymers from the cell walls of breeswing wheat bran: part I, polymers solubilised by alcali at 2°. **Carbohydr. Res.**, v.165, p. 99-113, 1987.

DUTTON, G. G. S.; HUNT, K. The constitution of the hemicelluloses of sitka spruce (*Picea sitchensis*). I. Composition of the hemicellulose and identification of 2-O-(4-O-methyl-D-glucopyranosiduronic acid)-D-xylose. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 80, p. 4420-4424, 1960.

EDA, S.; KATO, K. Galactan isolated from midrib of leaves of *Nicotiana tabacum*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, p. 2253-2257, 1978.

EDELMAN, 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.

EMONS, A. M.; MULDER, A. B. M. The making of the architecture of the plant cell wall: how cells exploit geometry. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 7215-7219, 1998.

EMONS, A. M.; MULDER, A. B. M. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. **Trends Plant Sci.**, v. 5(1), p. 35-40, 2000.

FEDER, N.; O'BRIEN, J. Plant microtechnique: some principles and new methods. **Amer. J. Bot.**, v. 55(1), p. 123-142, 1968.

FEMENIA, A.; RIGBY, N. M.; SELVENDRAN, R. R.; WALDRON, K. W. Investigation of the occurrence of pectic-xylan-xyloglucan complexes in the cell walls of cauliflower stem tissues. **Carbohydr. Polymers**, v. 39, p. 151-164, 1999a.

FEMENIA, A.; WALDRON, K. W.; ROBERTSON, J. A.; SELVENDRAN, R. R. Compositional and structural modification of the cell wall of cauliflower (*Brassica oleraceae* L. var *botrytis*) during tissue development and plant maturation. **Carbohydr. Polymers**, v. 39, p. 101-108, 1999b.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Polyoses (hemicelluloses). In: **Wood. Chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter, New York, 1989.

FLORIN, R. The female reproductive organs of conifers and taxads. **Biol. Review**, v. 29, p. 367-389, 1954.

FONG, C.; KIELISZEWSKI, M.; DE ZACKS, R.; LEYKAM, J. F.; LAMPORT, D. T. A. A gymnosperm extensin contains the serine-tetrahydroproline motif. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 548-552, 1992.

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

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Ann. Rev. Plant. Physiol.**, v. 37, p. 165-186, 1986.

FRY, S. C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: A possible relationship. **Physiol. Plant.**, v.75, p. 532-536, 1989.

GESHI, N.; JORGENSEN, B.; SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. *In vitro* biosynthesis of 1,4- $\beta$ -galactan attached to rhamnogalacturonan I. **Planta**, v.210, p. 622-629, 2000.

GOLFARI, L. **Coníferas aptas para reflorestamento nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. Rio de Janeiro, Ed. IBDF, 71 p., 1971.

GRAHAN, W; RUSSELL, W. L.; LOMAX, J. A; JARVIS, M. C.; LAPIERRE, C.; CHESSON, A. Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. **Carbohydr. Res.**, v. 272, p. 41-53, 1995.

GREEN, J. W. Wood cellulose. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 3, p. 9-21, 1963.

GÜNTER, E. A.; OVODOV, Y.S. Changes in cell wall polysaccharides of *Silene vulgaris* callus during culture. **Phytochemistry**, v. 59, p. 703-708, 2002.

HEBEISH, A.; RAGHEB, A. A.; HAGGAG, K.; RAHMAN, A.A. Oxidation of moghat mucilage with sodium chlorite. **Polym. Deg. Stab.**, v. 58, p. 33-44, 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.

HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. Chem. Soc.**, v. 107, p. 8-16, 1915.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 40, 139-168, 1989.

HAZENDONK, J. M.; REINERINK, E. J. M.; WAARD, P.; DAM, J. E. G. Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharide from fibre flax (*Linum unitatissimum* L.). **Carbohydr. Res.**, v. 291, p. 141-154, 1996.

HIGUCHI, T. Biosynthesis of wood components. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Wood**, ed. T.E. Timell, p.93-261, Springer, New York, 1997.

HIRST, E. L.; PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 287-298, 1960.

INOUE, M. T.; TORRES, D. V. Comportamento do crescimento de mudas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em dependência da intensidade luminosa. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 11 (1), p. 7-11, 1980.

INOUE, M. T.; RODERJAN, C. V.; KUNIYOSHI, Y. S. **Projeto Madeira do Paraná**. FUPF. p. 91- 97. Curitiba, 1984.

ISHII, T; MATSUNAGA, T; PELLERIN, P; O'NEILL, M. A.; DARVILL, A; ALBERSHEIM, P. The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. **J. Biol. Chem.**, v. 274 (19), p. 13098-13104, 1999.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T.; HAYASHI, N. Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. **Plant Physiol.**, v. 126: p. 1698-1705, 2001.

IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERIS C. G. Studies on the structure of wheat-endosperm arabinoxylans. **Carbohydr. Polymers**, v. 24, p. 61-71, 1994.

IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERIS C. G. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physiochemical properties. **Carbohydr. Polymers**, v. 28, p. 33-48, 1995.

JARVIS, A. C.; MCCANN, M. C. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts and methodology. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38 (1/2), p.1-13, 2000.

JOLY, A. B. **Botânica. Introdução à taxonomia vegetal.** Companhia Editora Nacional, São Paulo, 1991.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure and their interaction in the plant cell walls. In: **Xylans and xylanases.** Elsevier, Amsterdam, p. 1-15, 1993.

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



KATO, Y.; NEVINS, D. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-xylopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylopiranose as a component of *Zea* shoot cell-walls. **Carbohydr. Res.**, v. 138, p. 131-134, 1985.

KARNOVSKI, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electro microscopy. **J. Cell. Biol.**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KEEGSTRA, K; TALMADGE, K. W.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 188-196, 1973.

KELCH, D. Phylogeny of Podocarpaceae: comparison of evidence from morphology and 18S rDNA. **Am. J. Bot.**, v. 85 (7), p. 986-996, 1998.

KIELISZEWSKI, M.; LAMPORT, D. T. A. Purification and partial characterization of a hydroxyproline-rich glycoprotein in a graminaceous monocot, *Zea mays*. **Plant Physiol.**, v.85, p. 823-827, 1987.

KIELISZEWSKI, M.; DE ZACKS, R.; LEYKAM, J. F.; LAMPORT, D. T. A. A repetitive proline-rich protein from the gymnosperm Douglas Fir is a hydroxyproline-rich glycoprotein. **Plant. Physiol.**, v. 98, p. 919-926, 1992.

- KOBAYASHI, M.; NAKAGAWA, H.; ASAKA, T.; MATOH, T. Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by  $\text{Ca}^{2+}$  retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. **Plant Physiol.**, v. 119, p. 199-204, 1999.
- KOOIMAN, P.; ADAMS, G. A. Constitution of a glucomannan from tamarack (*Larix laricina*). **Can. J. Chem.**, v. 39, p. 889-896, 1961.
- KREUGER, M.; HOLST, G. J. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. **Planta**, v. 189, p. 243-248, 1993.
- KREUGER, M.; HOLST, G. J. Arabinogalactan proteins and plant differentiation. **Plant Mol. Biol.**, v. 30, p. 1077-1086, 1996.
- KUBACKOVA, M.; KARACSONYI, S.; BILISICS, L. Structure of galactoglucomannan from *Populus molinifera* H. **Carbohydr. Polymers**, v.19, p. 125-129, 1992.
- 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. (DESVEAUX et al., 1998; LEROUXEL et al., 2002)

LEVY, S.; MACLACHLAN, G.; STAEHELIN, L. A. Xyloglucan side chains modulate binding to cellulose during *in vitro* binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. **Plant J.**, v. 11(3), p.373-386, 1997.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** Plantarum Ltda., São Paulo, p. 35, 1992.

McGREGOR, A. W.; FINCHER, G.B. In: **Barley Chemistry & Technology**, eds. A.W. MacGregor and R. S. Bhatt. American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul, pp. 73-130, 1993.

MAINIERI, C.; PIRES, J.M. **O Gênero *Podocarpus* no Brasil.** Silvicultura em São Paulo, v. 8, São Paulo, 1973.

MARUYAMA, K.; GOTO, C.; NUMATA, M.; TOMONORI, S.; NAKAGAWA, Y.; HOSHINO, T. UCHIYAMA, T. O-acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of *Mentha*. **Phytochemistry**, v. 41(5), p. 1309-1314, 1996.

McCANN, M. C.; HAMMOURI, M.; WILSON, R.; BELTON, P.; ROBERTS, K. Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. **Plant. Physiol.**, v. 100, p. 1940-1947, 1992.

MASON, S. M.; COSGROVE, D. J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91 (14), p. 6574-6578, 1994.

McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. TAIZ, L.; JONES, R. L. The structure of plant cell walls. **Plant Physiol.**, v. 55, p. 64-68, 1975.

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structure plant-cell walls. 12. Identification of 7 differently linked glycosyl residues attached to O-4 of the 2,4-linked L-rhamnosyl residues of rhamnogalacturonan. **Plant Physiol.**, v. 70, p. 1586-1591, 1982.

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

MEIER, H. Fractionation by precipitation with barium hydroxide. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 45-46, 1965.

MELLEROWICZ, E. J. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Mol. Biol.**, v. 47(1/2), p. 239-274, 2001.

MICHELI, F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. **Trends Plant Sci.**, v. 6 (9), p 414-419, 2001.

- MILLS, A. R.; TIMELL, T. E. Constitution of three hemicelluloses from the wood of engelmann spruce (*Picea engelmanni*). **Can. J. Chem.**, v. 41, p. 1398-1395, 1963.
- MOLLARD, A.; DOMON, J.M.; DAVID, H.; JOSELEAU, J.P. Xylose-rich polysaccharides from the primary walls of embryogenic cell line of *Pinus caribaea*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.21, p. 189-194, 1997.
- MORRISON, I. M. Structural investigation on the lignin-carbohydrate complexes of *Lolium perenne*. **Biochem. J.**, v. 139, p. 197-204, 1974.
- NILSSON, M.; ANDERSSON, R.; ANDERSON, R. E.; AUTIO, K.; ÅMAN, P. Heterogeneity in a water-extractable rye arabinoxylan with a low degree of disubstitution. **Carbohydr. Polymers**, v. 41, p. 397-405, 2000.
- OBEL, N.; PORCHIA, A. C.; SCHELLER, H. V. Dynamic changes in cell wall polysaccharides during wheat seedling development. **Phytochemistry**, v. 60, p. 603-610, 2002.
- O'NEIL, M. A.; SELVENDRAN, R. R. Glycoprotein from the cell wall of *Phaseolus coccineus*. **Biochem. J.**, v. 187, p. 53-63, 1980.
- O'NEIL, M A; EBERHARD, S; ALBERSHEIM, P; DARVILL, A G Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. **Science**, v. 294 (5543), p. 846-849, 2001.

- ORFILA, C.; SEYMOUR, G. B.; WILLATS, W. G. T.; HUXHAM, I. M.; JARVIS, M. C. DOVER, C. J.; THOMPSON, A. J.; KNOX, P. Altered middle lamella homogalacturonan and disrupted deposition of (1→5)- $\alpha$ -l-arabinan in the pericarp of *Cnr*, a ripening mutant of tomato. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 210-221, 2001.
- PAULY, M.; QIN, Q.; GREENE, H.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; YORK, W.S. Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. **Planta**, v. 212 (5/6), 842-850, 2001.
- PEREIRA, J. A.; MAINIERI, C. Madeiras do Brasil. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, Rio de Janeiro, v.9 (9), p. 339-498, 1957.
- 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.
- PINTO, G.L.; MARTÍNEZ, M.; RIVAS, C. Chemical and spectroscopy studies of *Cercidium praeox* gum exudate. **Carbohydr. Res.**, v. 260, p. 17-25, 1994.
- PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 1513-1523, 2001.

PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: **Hemicelluloses and Hemicellulases**. Portland Press, London, 1993.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C. Lignin-hemicellulose complexes from the stem of *Mimosa bracinga*, Hoehne. **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 54, p. 579-584, 1982.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C.; GORIN, P. A. J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracinga). A study of O-acetyl group migration. **Carbohydr. Res.**, v.135, p. 129-140, 1984.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 57(6), p. 929-967, 2001.

ROBERTS, K. Structures at the plant cell surface. **Curr. Opinions Cell Biol.**, v. 2, p. 920-928, 1990.

ROSE, J. K. C.; BENETT, A. B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends Plant Sci.**, v. 4 (5), p. 1360-1365, 1999.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.**, v. 37(8), p. 336-343, 1954.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using Toluidine Blue O. **Stain Technol.**, v. 43 (5), p. 257-249, 1973.

SARKANEN, K. V.; HERGERT, H. L. Classification and distribution. In: **Lignins**. Wiley-Interscience, p. 43-89, Toronto, 1971.

SCHINDLER, T. M. A new view of the primary cell wall. **Z. Pflanzenernähr. Bodenk.**, v. 161, p. 499-508, 1998.

SCHWARZ, E. C. A.; TIMELL, T. E. Characterization of three hemicelluloses from the wood of amabilis fir (*Abies amabilis*). **Can. J. Chem.**, v. 41, p. 1381-1388, 1963.

SCOTT, J. E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 38-44, 1965.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry. Fundamentals and Applications**. 2ed, Academic Press, Inc., San Diego, 1993.



SMITH, C. J. Carbohydrate Chemistry. In: **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Ed. Lea, P. J.; Leegood, R. C., Wiley Publisher Science, p. 73-111, 1993.

SOGA, K.; WAKABAYASHI, K. S.; HOSON, T.; KAMISAKA, S. Gravitational force regulates elongation growth of *Arabidopsis* hypocotyls by modifying xyloglucan metabolism. **Adv. Space Res.**, v. 27 (5), p. 1011-1016, 2001.

STINARD, P. S.; NEVINS, D. J. Distribution of non-cellulosic  $\beta$ -D-glucans in grasses and other monocots. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1467-1468, 1980.

STOLLE-SMITS, T.; BEEKHUIZEN, J. G.; KOK, M. T. C.; PIJNENBURG, M. RECOURT, K.; DERKSEN, J.; VORAGEN, A. G. J. Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. **Plant Physiol.**, v. 121, p. 363-372, 1999.

SUN, R.; LAWATHER, J.M.; BANKS, W.B. Fractional and characterization of wheat straw hemicelluloses. **Carbohydr. Polymers**, v. 29, p. 325-331, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, Sinauer Associates, Massachusetts, 690 p., 2002.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1389, 1972.

TAKEUCHI, Y.; NICHIIYAUCHI, M.; AOYAMA, K.; SATO, A. Polysaccharides in primary cell walls of Japanese cypress cells in suspension culture. **Phytochemistry**, v. 41 (2), p. 461-463, 1996.

TAKEUCHI, Y.; KOMANIME, A. Turnover of cell wall polysaccharides of a *Vinca rosea* suspension culture. Synthesis and degradation of cell wall components. **Physiol. Plant.**, v. 48, p. 271-277, 1980.

THOMAS, J. R.; McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. **Plant Physiol.**, v.83, p.659-671, 1987.

THOMAS, J. R.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide that is a component of monocot cell-walls. **Carbohydr. Res.**, v. 185, p. 279-305, 1989.

TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses. Part I. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 19, p. 247-302, 1964.

TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses. Part II. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 20, p. 409-483, 1965.

TIMELL, T. E. Glucomannans. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 137-142, 1965.

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.

THOMPSON, J. E.; FRY, S. C. Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosilation in living plant cells. **Plant J.**, v. 26(1), p. 23-24, 2001.

TOMLINSON, P. B. Aspects of cone morphology and development in Podocarpaceae (Coniferales). **Int. J. Plant Sci.**, v. 153(4), p. 572-588, 1992.

TURNER, S. .R.; TAYLOR, N.; JONES, L. Mutations of secondary cell walls. **Plant. Mol. Biol.**, v. 47, p. 209-219, 2001.

TYMINSKI, A. TIMELL, T. E. The constitution of a glucomannan from white spruce (*Picea glauca*). **J. Am. Chem. Soc.**, v. 82, p. 2823-2827, 1960.

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

- VIERHUIS, E.; SCHOLS, H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Isolation characterisation of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki) at different ripening stages. **Carbohydr. Polymers**, v. 43, p. 11-21, 2000.
- VINCKEN, J. P.; KEIZER, A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 1579-1585, 1995.
- WALDRON, K. W.; BRETT, C. T. Effects of extreme acceleration on the germination, growth and cell wall composition of *Pea* epicotyls. **J. Exp. Bot.**, v. 41, p. 71-77, 1990.
- WALLACE, G.; RUSSELL, W. R.; LOMAX, J. A.; JARVIS, M. C.; LAPIERRE, C.; CHESSON, A. Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. **Carbohydr. Res.**, v. 272, p. 41-53, 1995.
- WENDE, G; FRY, S. C. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. **Phytochemistry**, v. 44(6), p. 1011-1018, 1997.
- WILKIE, K. C. B. Hemicellulose. When the world has  $10^{12}$  tons of an organic, renewable substance produced at the rate of  $10^{10}$  tons per year, don't yo think you should know about it? **Chemtech**, p. 306-319, 1983.

WHITNEY, S. E. C.; GOTHARD, M.G.E.; MITCHELL, J.T.; GIDLEY, M.J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary cell walls. **Plant Physiol.**, v. 121, p. 657-663, 1999.

WHITCOMBE, A. J.; O'NEIL, M. A.; STEFFAN, W.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan-II. **Carbohydr. Res.**, v. 271, p. 15-29, 1995.

WILKIE, C. B. The hemicelluloses of grasses and cereals. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 36, p. 215-265, 1979.

WILSON, R. H.; SMITH, A. C.; KACURÁKOVÁ, M.; SAUNDERS, P. K.; WELLNER, N.; WALDRON, K. W. The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-Transform infrared spectroscopy. **Plant Physiol.**, v. 124: p. 397-406, 2000.

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

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

WULFF, C.; NORAMBUENA, L.; ORELLANA, A. GDP-Fucose uptake into the golgi apparatus during xyloglucan biosynthesis requires the activity of a transporter-like protein other than the UDP-Glucose transporter. **Plant Physiol.**, v. 122, p. 867-878, 2000.

YEO, U.D.; KOHMURA, H.; NAKAGAWA, N.; SAKURAI, N. Quantitative and qualitative changes of cell wall polysaccharides during somatic embryogenesis and plantlet development of *Asparagus (Asparagus officinalis L.)*. **Plant Cell Physiol.**, v. 39(6), p. 607-614, 1998.

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.

ZANUTTINI, M.; CITRONI, M.; MARTINEZ, M. J. Application of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy to the quantitative determination of acetyl groups in wood. **Holzforschung**, v. 52, p. 263-267, 1998.

ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; SIERAKOWSKI, M.R.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F. A linear (1→5)-linked  $\alpha$ -L-arabinofuranan from the seeds of guapuruvu (*Schizolobium parahybum*), **Carbohydr. Res.** v. 233(2),p. 265-269, 1992.



# Are hemicelluloses from *Podocarpus lambertii* typical of gymnosperms?

R. Bochicchio, F. Reicher\*

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, CP 19046, Curitiba, PR 81531-990, Brazil

Received 12 December 2001; revised 27 March 2002; accepted 9 April 2002

## Abstract

*Podocarpus lambertii*, a Podocarpaceae, is a member of the most diverse family of conifers and *Araucaria angustifolia*, which belongs to the Araucariaceae family, is a typical gymnosperm from Southern Brazil. A structural characterisation of their hemicelluloses was carried out. The hemicelluloses were obtained by sequential and selective extraction with aqueous alkaline solvents, which resulted in the preparation of arabinoxylans (AGX) with different Xyl:Ara ratios, indicating the existence of distinct polysaccharides. Some are more exposed in the extraction process (higher arabinose content) and others which interact strongly with cellulose, had molecular mass differences, confirmed by HPSEC analysis. Isolated arabinoxylans and galactoglucomannans (GGM) had, by chemical and spectroscopic analysis, structural features similar to those found in other coniferous species. The hemicelluloses of *P. lambertii* and *A. angustifolia* had GGM:AGX ratios of 1.0:1 and 2.3:1, respectively. This proportion found in *A. angustifolia* is common to other gymnosperms. However, the content of AGX in *P. lambertii* is higher than expected, since that coniferous plants contain mainly GGM with a lower proportion of acidic arabinoglucuronoxylans. This discrepancy, added to the peculiar morphologic characteristics from the *Podocarpus* genus should probably be significant in the evolutionary process.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Hemicelluloses; Secondary cell wall; *Podocarpus lambertii*; *Araucaria angustifolia*; Arabinoxylan; Galactoglucomannan

## 1. Introduction

Podocarpaceae is, morphologically and ecologically, the most diverse family of conifers (Kelch, 1998). It has a distinctive characteristic, namely the presence of an ovule-supporting structure, denominated epimatium. This feature plays a part in a controversy since the epimatium was homologised with the perianth or the second integument of the angiosperm ovule (Tomlinson, 1992). On the other hand Florin (1954), interpreted cone development as a homologue of the ovuliferous scale of the other conifers, e.g. Pinaceae.

The polysaccharides of the cell wall have been frequently considered as taxonomic indicators. Lufrano and Caffini (1981) compared the composition of the mucilage from the leaves of four different species of *Chorisia* by phytochemical analysis, suggesting a chemotaxonomic approach at genus and species levels. Reid and Edwards (1995) suggested that low-galactose galactomannans are present in the seeds of species belonging to the more primitive

Caesalpiniaceae and medium to high galactose galactomannans are from more recent Fabaceae. The fine structure of galactomannans and arabinans from the seeds of *Schizolobium parahybae* and *S. amazonicum* have been also used as a chemotyping parameter (Petkowicz, Sierakowski, Ganter, & Reicher, 1998) and the results support the suggestion of Rizzini (1986) that they are not different species. Carpita and Gibeaut (1993) proposed molecular models for primary cell walls, involving their main polysaccharides and protein constituents and considered those from dicotyledonous species as Type I cell walls and from graminaceous monocotyledonea as Type II. Carpita, McCann, and Griffing (1996), then showed the components of primary cell wall to be a taxonomic character in the monocotyledonous species, ordering different groups. The hemicelluloses from secondary cell walls also have this potential since structurally distinct polysaccharides are components of cell walls from gymnosperms and angiosperms. Woody tissues from coniferous plants contain mainly galactoglucomannans (GGM) with a lower amount of arabinoglucuronoxylan, while angiosperms contain higher amounts of glucuronoxylan (Fengel & Wegener, 1989; Kubackova, Karacsonyi, & Bilisics, 1992; Sjöström, 1993). In a classical publication,

\* Corresponding author. Fax: +55-412-662-042.

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

Timell (1964) reported that in gymnosperms, the relative proportion of arabino-(4-*O*-methylglucurono)xylan varies considerably, even for species belonging to the same genus, consisting of about one third to one quarter of total hemicelluloses in the wood, whilst the major part is constituted by *O*-acetyl-GGM.

We now carry out a structural characterisation of the hemicelluloses from the stem of a Podocarpaceae (*Podocarpus lambertii*) and an Araucariaceae (*Araucaria angustifolia*), known in Brazil as pinheiro-bravo and pinheiro do Paraná, respectively. Both are native species of Southern Brazil, where *A. angustifolia* is considered to be a typical gymnosperm.

## 2. Experimental

### 2.1. Analysis of wood components

**Total sugar**—Determined by the phenol-sulfuric acid method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956) using xylose and glucose as standards.

**Uronic acids**—Determined by the *m*-hydroxybiphenyl method (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973), using glucuronic acid as standard.

**Lignin**—Determined gravimetrically, by the Klason method (Adams, 1965).

**Phenolic compounds**—Described by Boichichio, Gatter, and Reicher (2000), using the Folin-Ciocalteu reagent as in the Hartree method (Hartree, 1972). Coniferylic acid was used as standard.

**Protein**—Determined by the colorimetric method of Peterson (1977), using bovine serumalbumin as standard, and the method of Kjeldahl (Kabat & Mayer, 1964).

**Monosaccharide composition**—Polysaccharide fractions were hydrolysed with 1 M trifluoroacetic acid (5 h, 100 °C) or 72% w/v sulfuric acid (1 h, 0 °C), followed by dilution to 8% w/v (5 h, 100 °C), neutralisation with barium carbonate and filtration. Hydrolysates were reduced with sodium borohydride and acetylated with pyridine-acetic anhydride (1:1 v/v), at room temperature. The resulting alditol acetates were analysed by gas-liquid chromatography (GLC) using model, HP 5240, at 250 °C with a DB-225 column.

### 2.2. Preparation of hemicelluloses

The milled woody tissues of *P. lambertii* and *A. angustifolia* (30 g; 120 mesh) were extracted with toluene:ethanol (2:1, v/v) for 20 h in a Soxhlet apparatus and the dried material was then submitted to delignification by the chlorite method (Timell, 1965). In this 40% sodium chlorite (24.5 ml), acetic acid (3.5 ml) and distilled water (490 ml) were added to the defatted samples and the temperature maintained at 70 °C for 6 h (Boichichio et al., 2000). The residues were filtered, washed with ethanol and dried. The delignified residues were submitted as follows to three procedures for extraction of hemicelluloses:

1. Initial extraction with 4 M NaOH, followed by 4 M KOH (*P. lambertii*; Fig. 1a).
2. Initial extraction with 4 M KOH, followed by 4 M NaOH (*P. lambertii*; Fig. 1b).

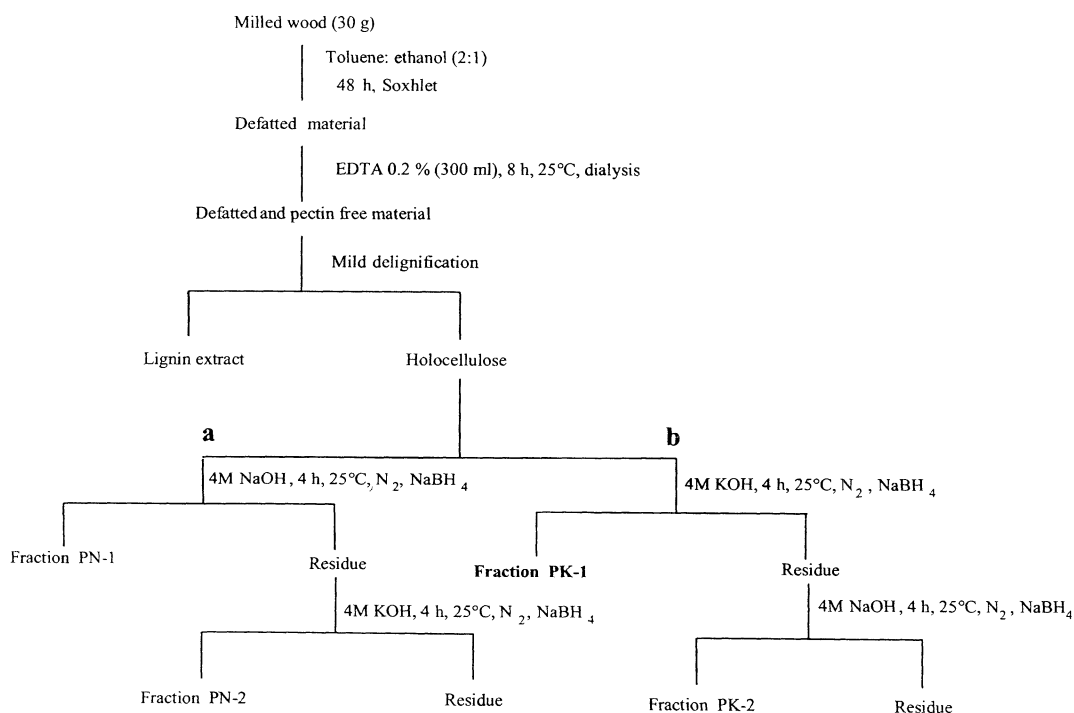


Fig. 1. Selective alkaline extraction of the stem from *P. lambertii*.



3. Sequential extraction with 1, 2, and 4 M KOH (twice), followed by 4 M NaOH (twice) (*P. lambertii*; Fig. 2). A similar procedure was used for *A. angustifolia*, beginning with 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 M KOH, followed by 1 and 4 M NaOH (Fig. 3).

In each extraction step, a ratio of 1 g to 10 ml of solvent was used, at 25 °C for 4 h.

The alkaline extracts containing hemicellulosic fractions were acidified to pH 5 with acetic acid and dialysed for 3 days, and 4 volumes ethanol were then added to the solution. The final residue was suspended in water, neutralized, and dried.

Fractions of acidic arabinoxylan (AGX) (KOH soluble) from *P. lambertii* (PK-1; Fig. 1b; PK-A and PK-F; Fig. 2) and *A. angustifolia* (AK-A to AK-E; Fig. 3) were studied. The final extraction steps with NaOH, yielded fractions of galactoglucomannan (GGM) from *P. lambertii* (PK-G; Fig. 2) and *A. angustifolia* (AK-F; Fig. 3), which were submitted to structural analysis.

### 2.3. Analysis by HPSEC

The elution profiles of AGX of PK-1, PK-A and PK-F from *P. lambertii* and AK-A to AK-F from *A. angustifolia* were determined by high performance size-exclusion chromatography (HPSEC), using a WATERS 510 HPLC

pump at 0.6 ml/min, with four gel permeation columns in series with exclusion sizes of one million to five thousand, using a refractive index (RI) detector. The eluent was 0.1 mol/l NaNO<sub>3</sub> with 200 ppm NaN<sub>3</sub>. Samples, previously filtered in membrane (0.22 μm; Millipore), were injected (250 μl loop) at a 2 mg/ml concentration.

### 2.4. Structural characterisation

#### 2.4.1. Methylation

The GGM fractions, PK-G and AK-F, were pre-*O*-methylated using the Haworth method (Haworth, 1915; Hirst & Percival, 1960), followed twice by that of Ciucanu and Kerek (1984). AGX fractions, PK-1, PK-A and AK-A, were methylated directly by the Ciucanu and Kerek method (twice). The methylated AGX fractions were subjected to methanolysis with methanol–HCl (2 ml), 2 h, 65 °C, followed by neutralisation with AgCO<sub>3</sub>. The samples were hydrolysed with 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 ml), 6 h, neutralised with BaCO<sub>3</sub> and filtered. The methylated GGM fractions were directly hydrolysed by Saeman's method (Saeman, Moore, Mitchell, & Millet, 1954). The partially methylated alditol acetates were analysed by GLC VARIAN 3300 at 220 °C, coupled to a FINNIGAN MAT mass spectrometer, using DB-225 and DB-210 (30 m × 0.25 mm i.d.) capillary columns. Helium was used as the carrier gas.

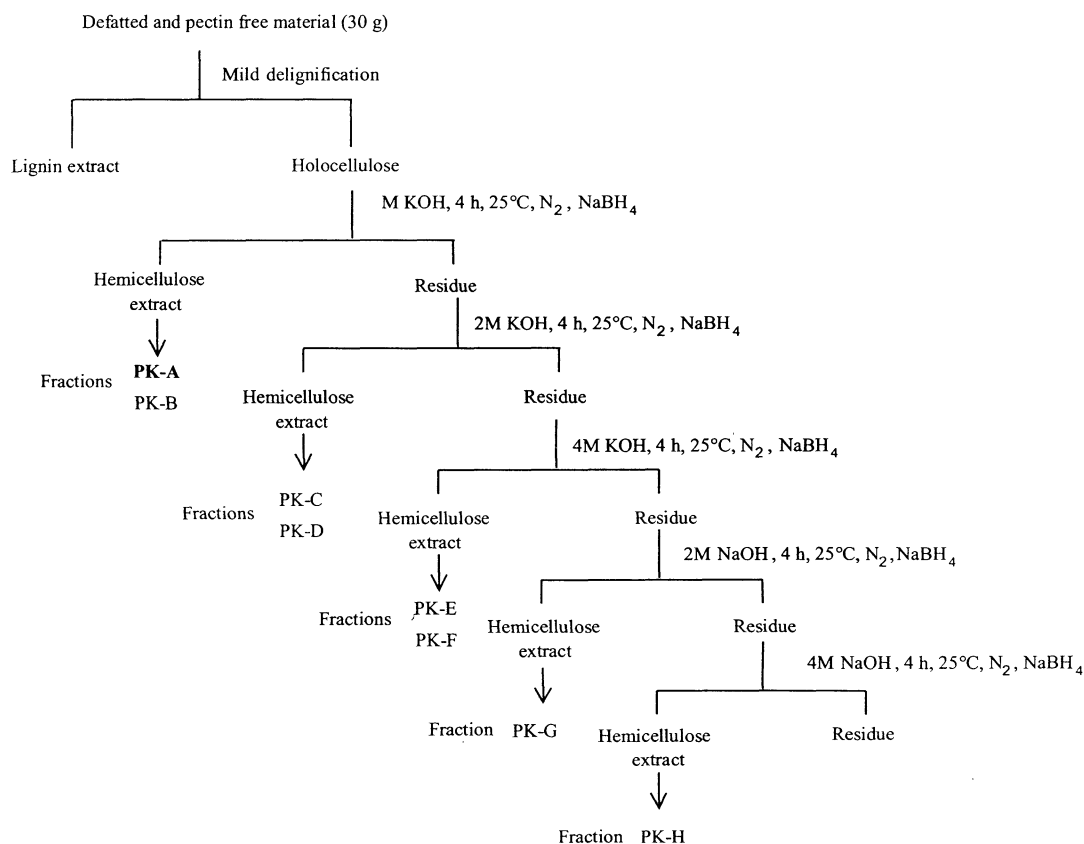


Fig. 2. Sequential alkaline extraction from *P. lambertii*.

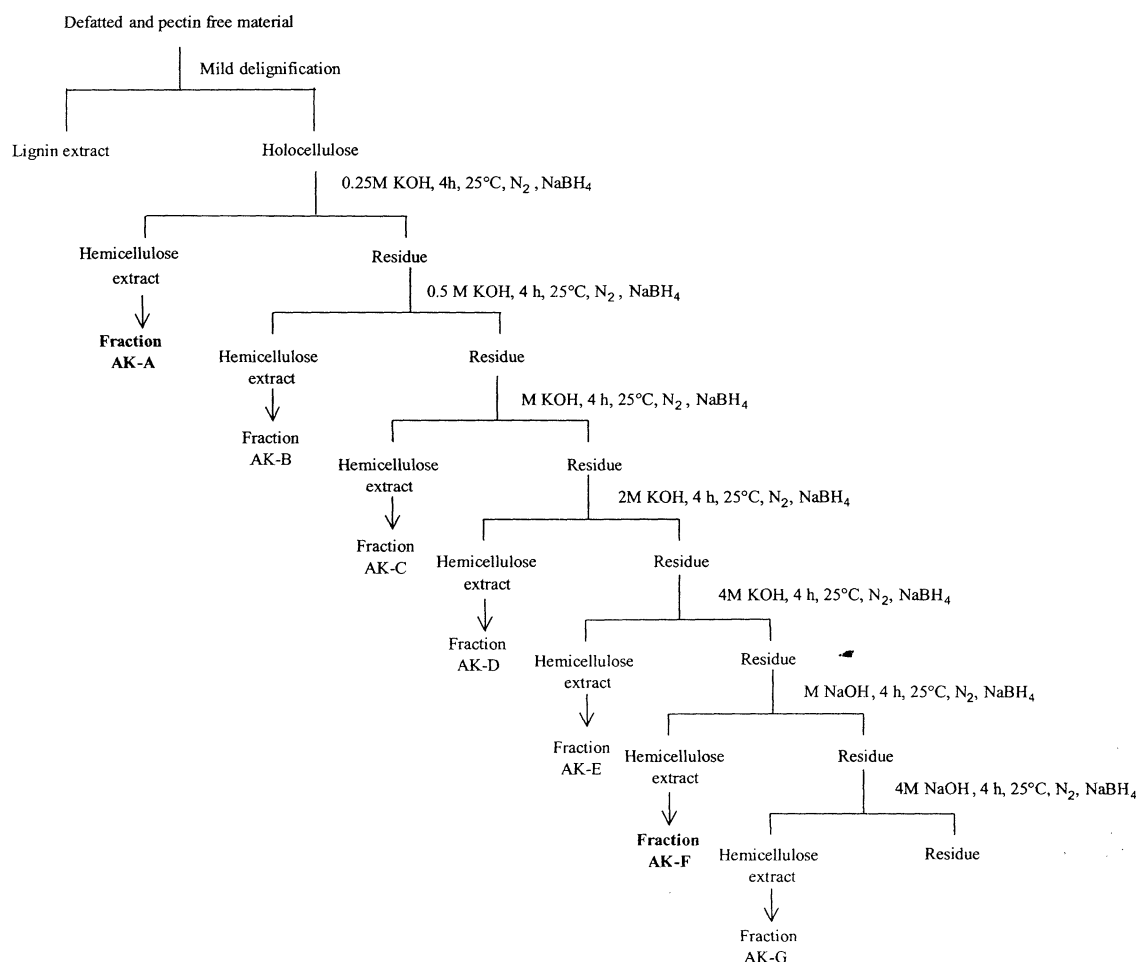


Fig. 3. Sequential alkaline extraction from *A. angustifolia*.

The partially methylated monosaccharides were reduced, acetylated and analysed by GC-MS.

#### 2.4.2. NMR spectroscopy

Examinations were carried out by  $^{13}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  DEPT for the AGX fraction (PK-1; AK-A), in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $30^\circ\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMQC for the GGM fraction (PK-G; AK-F), in 1% NaOH in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $30^\circ\text{C}$ , both using a Bruker 400 MHz DRX spectrometer (shifts expressed as  $\delta$  ppm, relative to  $\text{Me}_4\text{Si}$ ,  $\delta = 0$ ).

### 3. Results and discussion

*P. lambertii*, now used as a source of hemicelluloses, is native to Brazil, belonging to the Podocarpaceae family, gymnosperm division. The stem contains 32% lignin, a value common for other wood gymnosperms (Sarkanen & Hergert, 1971). The powdered wood was defatted with toluene:ethanol to remove lipids (0.8%) and then with EDTA to extract pectic material (0.1% w/w).

As the yield of hemicelluloses from *P. lambertii* was very low (0.5% w/w) when extracted with aqueous alkali, delignification by the chlorite method was carried out according to Timell (1965). In the present investigation, only half the amounts of sodium chlorite and acetic acid were employed. This modification resulted in the liberation of hemicelluloses from *P. lambertii* with a similar efficiency to alkali treatments (Bochicchio et al., 2000). Subsequent extraction with 4 M NaOH (Fig. 1a) gave rise to greater yields of hemicelluloses (PN-1 15.4% w/w; Fig. 1a; Table 1). The monosaccharide composition of PN-1 (Man:Xyl 1.2:1 ratio) indicates that it contains a mixture of acidic arabinoxylans (AGX) and GGM and that the relative proportion of xylose in PN-1 was higher than expected for gymnosperms, showing a higher content of GGM, in agreement with other investigations (Adams, 1965; Aspinall, 1959; Croon & Lindberg, 1958; Dutton & Hunt, 1960; Fengel & Wegener, 1989; Tyminski & Timell, 1960). A similar result for PN-1 was found when the delignified wood of *P. lambertii* was totally hydrolysed (cell wall fraction; Table 1; Man:Xyl 1.0:1 ratio).

Table 1  
Monosaccharide composition of the cell wall and fractions obtained by sequential alkali extraction from *P. lambertii* wood

Fraction	Yield <sup>a</sup> (g%)	Monosaccharide composition (% mol)							
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Uronic acids
Cell wall <sup>b</sup>	–	2.0	0.3	7.9	25.0	24.0	10.8	30.0	nd
PN-1 (4 M NaOH)	15.4	1.2	0.8	4.6	30.5	36.6	5.1	11.5	9.7
PN-2 (4 M KOH)	0.1	2.8	0.8	18.9	31.3	10.3	4.8	6.1	25.0

<sup>a</sup> From delignified residue.

<sup>b</sup> Hydrolysis with sulfuric acid (Saeman et al., 1954).

Table 2  
Monosaccharide composition of the fractions obtained by selective alkali extraction from *P. lambertii* wood

Fractions	Yield <sup>a</sup> (g%)	Monosaccharide composition (mol%)								Phenolics (%) <sup>b</sup>
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Uronic acids	
PK-1 (4 M KOH)	12.6	0.8	0.3	8.2	41.2	8.0	6.8	5.8	28.9	11.6
PK-2 (4 M NaOH)	6.5	0.3	0.1	1.3	5.8	62.4	2.7	19.7	7.7	5.3
Residue	–	1.4	–	4.5	10.0	28.5	6.7	48.9	nd	nd

<sup>a</sup> From delignified residue.

<sup>b</sup> Boichicchio et al. (2000) and Hartree (1972).

When the residue from the NaOH extract was then treated with 4 M KOH a fraction rich in xylose was obtained, although in low yield (PN-2; 0.1% w/w). This indicated that initial extraction with NaOH liberated 99% of the total available hemicelluloses.

An alternative extraction process was performed using aqueous KOH as the first solvent (Fig. 1b), which is selective to xylans (Capek et al., 2000; Timell, 1964, 1965). Results are shown in Table 2.

The main monosaccharide unit in PK-1 (4 M KOH; 12.6% w/w) was xylose (41.1%), indicating the presence of an arabinoxylan. In PK-2 (4 M NaOH; 6.5% w/w), mannose (62.4%) was the principal monosaccharide, indicating the presence of a galactoglucomannan. It is interesting to observe that the yields of PK-1 and PK-2 (19.1% w/w) are consistent with that of the fraction extracted initially with NaOH (PN-1; Table 1). This result confirms the efficiency and selectivity of KOH for obtaining arabinoxylan.

The yield of PK-1 is about twice greater than that of PK-2. However, this is probably due to the high content of phenolics, higher in PK-1 (Table 2). These were determined using the Folin-Ciocalteu reagent (Hartree, 1972), using coniferylic acid as standard (Boichicchio et al., 2000). Considering that the final residue of these extraction containing about 5% of hemicelluloses, this set of experiments confirms that *P. lambertii* wood contains similar amounts of AGX and GGM.

Treatment with increasing concentration of alkali can expose different AGX (Du Pont & Selvendran, 1987; Izydorczyk & Biliaderis, 1995; Sun, Lawther, & Banks, 1996). Therefore, another extraction strategy was used, beginning with a milder extraction (two times M KOH) to 4 M KOH and NaOH (Fig. 2). Results are shown in Table 3. The initial treatment with M KOH resulted in extraction of ~65% of available hemicelluloses, whose arabinose content was ~20% (PK-A). A similar arabinose content

Table 3  
Monosaccharide composition of the fractions obtained by sequential alkaline extractions from *P. lambertii* wood

Fraction	Yield <sup>a</sup> (g%)	Monosaccharide composition (mol%)							
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Uronic acids
PK-A (1 M KOH)	13.8	2.4	0.5	20.7	36.9	12.4	13.0	5.1	9.0
PK-B (1 M KOH)	1.0	1.3	0.3	17.5	26.2	22.8	13.1	6.8	12.0
PK-C (2 M KOH)	2.2	0.2	0.4	6.7	31.7	29.1	5.2	9.8	16.9
PK-D (2 M KOH)	1.0	0.8	0.5	5.0	19.8	38.4	7.2	13.6	14.7
PK-E (4 M KOH)	0.7	0.7	0.4	4.7	22.9	38.3	5.2	12.9	13.9
PK-F (4 M KOH)	0.2	1.4	0.5	6.4	21.5	33.0	17.0	11.1	9.1
PK-G (4 M NaOH)	1.6	0.3	0.1	1.3	3.0	71.3	2.3	18.6	3.1
PK-H (4 M NaOH)	0.8	0.4	0.1	1.8	5.9	67.3	2.5	19.0	3.0

<sup>a</sup> From delignified residue.

Table 4  
Monosaccharide composition of the cell wall and fractions obtained by sequential alkaline extractions from *A. angustifolia*

Fraction	Yield <sup>a</sup> (g%)	Monosaccharide composition (mol%)							
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Uronic acids
Cell wall <sup>b</sup>		1.3	–	4.4	15.9	36.0	7.1	35.3	nd
AK-A (0.25 M KOH)	4.0	1.6	–	14.2	49.4	3.6	8.0	6.1	17.1
AK-B (0.5 M KOH)	1.3	0.9	–	10.6	57.6	7.9	6.1	3.3	13.6
AK-C (1 M KOH)	1.4	0.6	–	9.0	49.1	12.2	4.8	5.3	19.0
AK-D (2 M KOH)	1.8	0.6	0.2	7.9	43.9	16.1	5.2	6.0	20.1
AK-E (4 M KOH)	0.6	0.3	0.3	8.5	42.2	25.7	3.4	6.1	13.5
AK-F (M NaOH)	0.4	0.3	–	2.9	12.0	57.6	5.2	15.6	6.4
AK-G (4 M NaOH)	2.0	0.8	–	1.7	7.3	67.9	2.1	15.7	4.5

<sup>a</sup> From delignified material.

<sup>b</sup> Hydrolysis with sulfuric acid (Saeman et al., 1954).

was found for PK-B, although this fraction was obtained in a lower yield. The Xyl:Ara ratio in subsequent fractions (PK-C to PK-F) increased with concentration of alkali, suggesting the presence of different molecular families. PK-A was further submitted to structural analysis.

It was observed that comparing PK-B until PK-F (Table 3), mannose and glucose increased and the mannose to glucose ratio was almost constant (~3.5:1), indicating that GGM with the same structure are probably present in these fractions. The existence of arabinose and xylose in these fractions indicate that AGX are also present. An increase in the concentration of KOH was employed in order to obtain GGM free of AGX, as can be observed in PK-G, obtained with NaOH (71.3% mannose; 18.6% glucose. Thus the stem from the pinheiro do Paraná (*A. angustifolia*), a typical gymnosperm from Southern Brazil, were used for comparative analysis.

Initially, delignified wood of *A. angustifolia* gave in a Man:Xyl ratio of 2.3:1 (cell wall fraction; Table 4), in agreement with to other studied gymnosperm species (Croon & Lindberg, 1958; Fengel & Wegener, 1989; Kooiman & Adams, 1961; Meier, 1958; Tyminski & Timell, 1960), and in contrast with the 1.0:1 ratio obtained for *P. lambertii*, under the same experimental conditions (Table 1).

Knowing that 1 M KOH proved to be efficient in extracting most available hemicelluloses from secondary

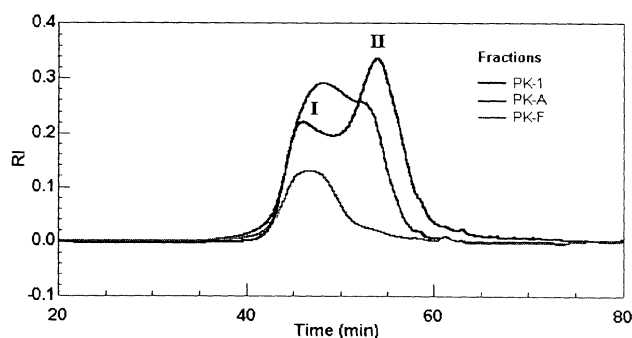


Fig. 4. HPSEC of the AGX (fractions PK-1, PK-A and PK-F) from *P. lambertii*.

cell wall, the extraction process was initiated with 0.25 M KOH (Table 4). This concentration extracted 4% w/w of hemicellulose (AK-A) with a relatively high arabinose substitution (Xyl:Ara (3.5:1) ratio). The subsequent fractions (AK-B to AK-G) yielded about 7.5% w/w of hemicelluloses with lower degrees of substitution. Successive treatments with KOH extracted AGX and the final treatment with NaOH solubilised the available GGM, according to the results found with *P. lambertii*.

Fractions AK-A (AGX) and AK-F (GGM) were further submitted to structural analysis.

### 3.1. HPSEC analysis

PK-1, PK-A and PK-F (*P. lambertii*), AK-A to AK-F (*A. angustifolia*) water-soluble fractions, rich in AGX, were submitted to HPSEC analysis. The filtration process (0.22  $\mu$ m pore) eliminated GGM contamination. This polysaccharide, due to its low water solubility, was retained in the membrane.

Fraction PK-1, obtained directly with 4 M KOH (Fig. 4), showed two distinct peaks with predominance of peak II (lower molar mass). Fraction PK-A (initial extraction with 1 M KOH; Fig. 1b) resulted in a heterogeneous elution profile with two peaks, although showing greater amounts of AGX with a high molecular mass. It is interesting to observe that PK-F (final extraction with 4 M KOH; Fig. 2) gives

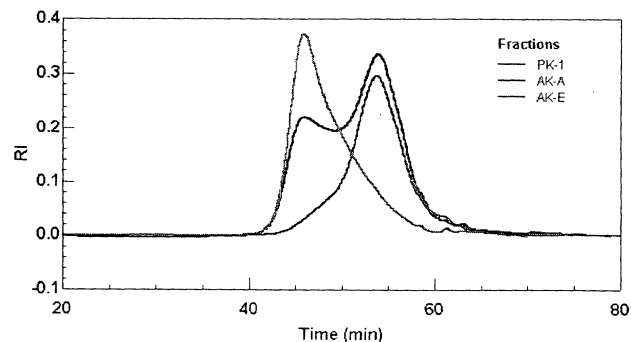
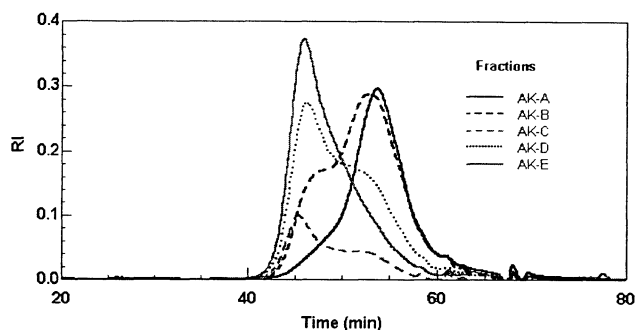


Fig. 5. HPSEC of the fractions KOH soluble PK-1 (*P. lambertii*), AK-A and AK-E (*A. angustifolia*).

Fig. 6. HPSEC of the KOH fractions from *A. angustifolia*.Table 5  
<sup>13</sup>C NMR signals of the fraction PK-1 from *P. lambertii*

	Chemical shift (ppm)				
	C-1	C-4	C-5	C-6	OMe
→ 4)-βXylp-(1-	101.5	73.5	62.8	–	
→ 4)-βXylp-(1-substituted	101.2			–	
→ 3)-αAraf-(1-	107.5		61.2	–	
→ 2)-4-OMe-αGlcAp-(1-	97.4			176.6	59.6

only one AGX (corresponding to peak I), suggesting that it is probably intimately linked with other cell wall components, while more highly substituted AGX of low molecular mass could be more exposed, because it was obtained with a low concentration of alkali.

This hypothesis can be demonstrated comparing AGX of *P. lambertii* and *A. angustifolia* (Fig. 5). Fraction AK-A, extracted by 0.25 M KOH from *A. angustifolia*, was practically homogeneous, with a peak corresponding to

PK-1 (*P. lambertii*) of lower molecular mass (peak II). The increase in concentration of alkali (4 M KOH; AK-F) liberated only AGX with higher molecular masses (Fig. 4), the same for peak I from PK-1 and PKF (Fig. 4). Fig. 6 confirms these results where the molecular mass increased with the alkali concentration from AK-A to AK-E from *A. angustifolia*.

These results confirm the existence of a family of AGX, some being more exposed (higher arabinose content, Table 4) and others interacting strongly with cellulose, with molecular mass differences between these AGX. Izydorczyk and Biliaderis (1995), studying hemicelluloses from cereals, demonstrated the existence of the several families of AGX, obtained by diverse extraction methods.

### 3.2. Structural characterisation of AGX fractions

AGX from *P. lambertii* and *A. angustifolia* (PK-1 and AK-A, respectively) were submitted to NMR and methylation analysis.

The <sup>13</sup>C NMR examination of PK-1 (Table 5) gave a complex spectrum, whose anomeric region contained two signals, corresponding to β-Xylp, substituted at O-2 (δ 101.2) and non-substituted (δ 101.5) with α-arabinofuranosyl units attached to O-3 of a monosubstituted xylose residue in the main chain (δ 107.5). The 4-O-substituted β-Xylp units in the main chain is confirmed by a δ 73.5 signal. The C-5 signal at δ 62.8 (Araf) and δ 61.2 (Xylp), were indicated by inverted <sup>13</sup>C DEPT signals (Fig. 7).

The presence of 4-O-Me-α-uronic acid was confirmed by signals at δ 97.4 and δ 176.6 corresponding to C-1 and C-6, respectively; a signal at δ 59.6 showed the OMe groups. The presence of fragments of lignin was demonstrated by a signal

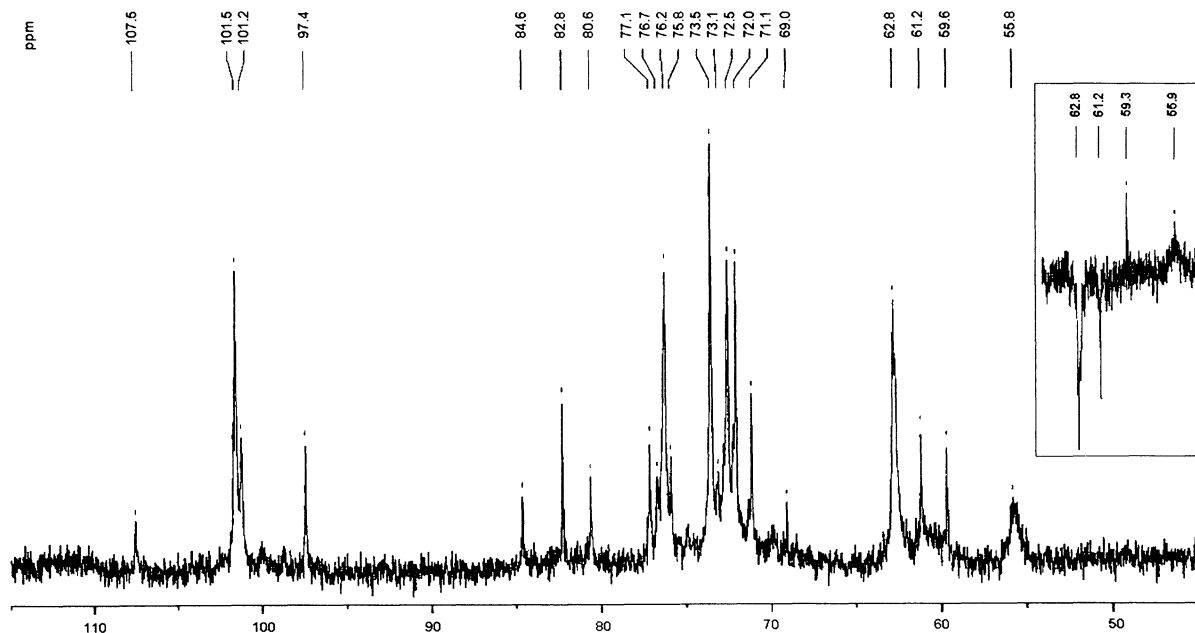
Fig. 7. <sup>13</sup>C NMR and <sup>13</sup>C DEPT spectrum of the fraction PK-1 in D<sub>2</sub>O.

Table 6

Analysis of the partial methylated monosaccharides from the acidic arabinoxylan (fractions PK-1 and AK-A)

O-methyl alditol acetate	Fragments ( <i>m/z</i> )	<i>P. lambertii</i> (PK-1) (%mol)	<i>A. angustifolia</i> (AK-A) (%mol)
2,3,5-Me <sub>3</sub> Ara	87, 101, 117, 129, 145, 161	12.3	15.3
2,3-Me <sub>2</sub> Ara	87, 101, 117, 129, 189	3.2	–
6-Deoxy-2 Me Hex	87, 99, 117, 129, 159, 173, 201	1.2	–
2,3,4-Me <sub>3</sub> Xyl	87, 101, 117, 129, 145, 161	3.2	2.8
2,3-Me <sub>2</sub> Xyl	87, 101, 117, 129, 161, 189	59.8	59.9
6-Deoxy-3 Me Hex	87, 101, 117, 129, 143, 189, 203	1.3	–
2-Me Xyl	87, 99, 129, 145, 189	9.0	9.4
3-Me Xyl	85, 87, 99, 113, 117, 129, 159	10.0	9.6

Table 7

<sup>13</sup>C NMR signals of the fraction PK-G from *P. lambertii*

	Chemical shift (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
→ 4)-Manp-(1-	100.2	70.3	71.7	76.4	75.3	60.7
→ 4)-GlcP-(1-	102.7	73.2	75.0	78.6	74.5	60.5

in  $\delta$  55.8, arising from methoxyl groups (Wallace et al., 1995), released after chlorite treatments. Similar assignments of all signals were obtained to AK-A.

These NMR data were complemented with methylation analysis, where the partially *O*-methylated alditol acetates obtained by hydrolysis from the fractions were identified by GC-MS. The results are listed in Table 6.

The (1 → 4) linkage in the main chain of the PK-1 was identified through 2,3-Me<sub>2</sub>Xyl (59.8%). This peak could be also, under the experimental conditions used, 3,4-Me<sub>2</sub>Xyl, however, this is not likely. The main chain is partially substituted at O-3 by arabinosé (2,3,5-Me<sub>3</sub>Ara) or uronic acids probably at O-2. The 2,3-Me<sub>2</sub>Ara can arise from an ether linkage at O 5 of arabinose units with phenolic residues from the wood lignin, as shown by Izydorczyk and Biliaderis (1994), Sjöström (1993) and Wallace et al. (1995), who investigated hemicelluloses of the straw cell wall, also identifying the presence of this methylated derivative and attributing it to an intermediary arabinose between xylose of the main chain and terminal arabinose. Rhamnose or fucose derivatives were also identified, according to its monosaccharide composition. The presence of these monosaccharides in all hemicellulose fractions

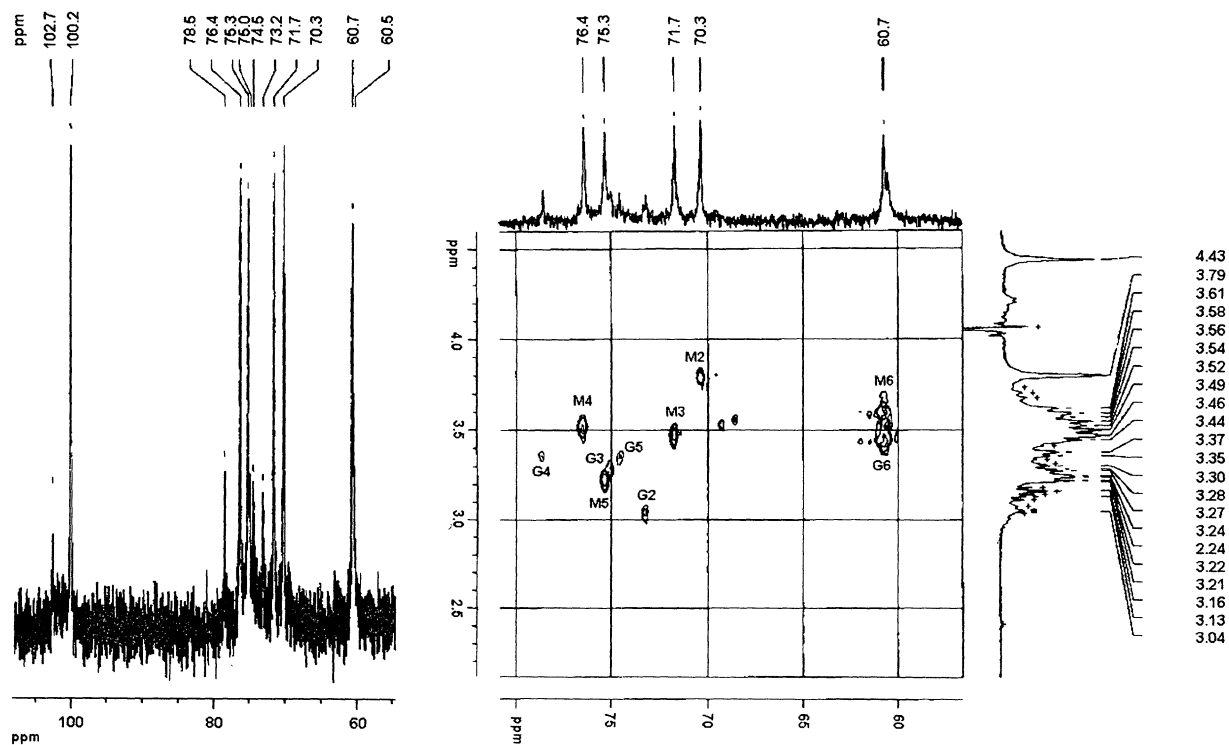
Fig. 8. <sup>13</sup>C NMR and HMQC spectrum of the fraction PK-G in 1% NaOD.

Table 8

Analysis of the partial methylated monosaccharides from the galactoglucomannan (fractions PK-G and AK-F)

O-methyl alditol acetate	Fragments ( <i>m/z</i> )	<i>P. lambertii</i> (PK-G) (mol%)	<i>A. angustifolia</i> (AK-F) (mol%)
2,3,6-Me <sub>3</sub> Man	99,101,113,117,129,131,161,173	71.0	75.2
2,3,6-Me <sub>3</sub> Glc	99,101,113,117,129,131,161,173	23.3	19.0
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Man	87,101,117,129,145,161,205	1.8	1.0
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Glc	87,101,117,129,145,161,205	0.8	0.4
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Gal	87,101,117,129,145,161,205	1.1	1.5
2,3-Me <sub>2</sub> Man	87,101,117,129,143,203	2.0	1.8
2,3-Me <sub>2</sub> Glc	87,101,117,129,143,203	–	1.1

from *P. lambertii* suggest the possibility of their participation of the AGX. The AGX of *A. angustifolia* (AK-A) showed similar structural characteristics for the AGX of *P. lambertii*, except for the absence of the 2,3-*O*-methylated derivative of arabinose (Table 6). Neither rhamnose nor fucose derivatives were found. The monosaccharide composition and structural analyses of AK-E (methylation and NMR), demonstrated structural characteristics similar to the other AGX, except for lower 3-*O*-Me Xyl contents in AK-E (data not shown).

### 3.3. Structural characterisation of GGM fractions

After exhaustive extraction of AXG by KOH, the GGMs were sequentially obtained by NaOH extraction (Fig. 2) with low AGX contaminants. The monosaccharide ratios of *A. angustifolia* (Man:Gal:Glc 4.0:1:0.1) and *P. lambertii* (Man:Gal:Glc 3.5:1:0.1) show them to be GGM ratios typical of other gymnosperms. The selected fractions (PK-G; *P. lambertii*; Fig. 2 and AK-F; *A. angustifolia*; Fig. 3) were submitted to structural elucidation.

<sup>13</sup>C NMR examination of PK-G indicated twelve signals characteristics of a linear glucomannan (Table 7). The low amount of galactose did not manifest itself in the spectrum.

The signals of the anomeric carbons indicate Man<sub>p</sub> and Glc<sub>p</sub> units with a β configurations. The possible partial overlapping of C-6 signals of Man<sub>p</sub> and Glc<sub>p</sub> was resolved through HMQC spectrum (Fig. 8), which amplified the separation through carbon and proton correlation.

The methylated derivatives were obtained in order to confirm the NMR data. Table 8 indicates the partially methylated alditol acetates from PK-G and AK-F, which was approximately consistent with the Man:Glc:Gal ratio.

The 2,3,6-Me<sub>3</sub> Man and 2,3,6-Me<sub>3</sub>Glc components represent (1 → 4) linked mannosyl and glucosyl residues, respectively. Both are from the main chain, being eventually substituted by galactosyl residues (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Gal). In PK-G (*P. lambertii*) only mannose is substituted at O-6 (2,3-Me<sub>2</sub>Man; 2.0%), whilst in AK-F (*A. angustifolia*) mannosyl and glucosyl residues are attached to galactose, both through O-6.

## 4. Conclusions

Acidic AGX and GGM were found in *P. lambertii* and *A. angustifolia*, aqueous NaOH and KOH being used in order to obtain the hemicelluloses. With NaOH, mixtures of AGX and GGM were obtained whereas KOH was selective for AGX. HPSEC analysis showed the existence of a family of AGX, in both species, some being more exposed and others interacting strongly with cellulose. Increases in concentration of alkali liberated only AGX with a higher molecular mass. It should be to emphasize the use of HPSEC has not been common in the comparative analysis of AGX in different species. Isolated AGX and GGM showed structural features similar to those found in other coniferous species. However, the Man:Xyl ratio of *P. lambertii* is 1.0:1 (cell wall fraction; Table 1), contrasting with Man:Xyl ratio from *A. angustifolia* that is 2.3:1 (cell wall fraction; Table 4). This is a proportion obtained in other investigations and which confirms a greater presence of GGM in gymnosperms (Croon & Lindberg, 1958; Fengel & Wegener, 1989; Kooiman & Adams, 1961; Meier, 1958; Sjöström, 1993; Tyminski & Timell, 1960). The discrepancy in *P. lambertii*, added to peculiar morphologic characteristics should probably be significant in the evolutionary process of the *Podocarpus* genus.

## References

- Adams, G. A. (1965). Lignin determination. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 185–187.
- Aspinall, G. O. (1959). Structural chemistry of the hemicelluloses. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 14, 429–468.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54, 484–489.
- Bochicchio, R., Ganter, J. L. M. S., & Reicher, R. (2000). Isolation of hemicelluloses from the xylem of *P. lambertii*: Delignification process. *Proceedings from the Third International Symposium on Natural Polymers and Composites, São Pedro*, 189–193.
- Capek, P., Kubackova, M., Alföldi, J., Bilisics, L., Liskova, D., & Kakoniová, D. (2000). Galactoglucomannan from the secondary cell wall of *Picea abies* L. Karst. N. *Carbohydrate Research*, 329, 635–645.
- Carpita, N., & 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 Journal*, 3(1), 1–30.
- Carpita, N., McCann, M., & Griffing, L. R. (1996). The plant extracellular matrix: News from the cell's frontier. *Plant Cell*, 8(9), 1451–1463.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209–217.
- Croon, I., & Lindberg, B. O. (1958). Studies on glucomannan from Norwegian spruce. *Acta Chemica Scandinavica*, 12, 453–456.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Du Pont, M. S., & Selvendran, R. R. (1987). Hemicellulosic polymers from the cell walls of wheat bran: Part I, polymers solubilised by alkali at 2 °C. *Carbohydrate Research*, 165, 99–113.
- Dutton, G. G. S., & Hunt, K. (1960). The constitution of the hemicelluloses of sitka spruce (*Picea sitchensis*). I. Composition of the hemicellulose and identification of 2-O-(4-O-methyl-D-glucopyranosiduronic acid)-D-xylose. *Journal of the American Chemical Society*, 80, 4420–4424.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1989). *Polyoses (hemicelluloses)*. *Wood Chemistry, ultrastructure, reactions*, New York: Walter de Gruyter, pp. 106–127.
- Florin, R. (1954). The female reproductive organs of conifers and taxads. *Biological Review*, 29, 367–389.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48, 422–427.
- Haworth, W. N. (1915). A new method of preparing alkylated sugars. *Journal of the Chemical Society*, 107, 8–16.
- Hirst, E. L., & Percival, E. (1960). Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 287–298.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1994). Studies on the structure of wheat-endosperm arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 24, 61–71.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1995). Ceréal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28, 33–48.
- Kabat, E. A., & Mayer, M. M. (1964). Kjeldahl nitrogen determination. In C. C. Thomas (Ed.), *Experimental immunochemistry* (pp. 476–483). Springfield, IL: Bannerstone House.
- Kelch, D. (1998). Phylogeny of Podocarpaceae: Comparison of evidence from morphology and 18S rDNA. *American Journal of Botany*, 85(7), 986–996.
- Kooiman, P., & Adams, G. A. (1961). Constitution of a glucomannan from tamarack (*Larix laricina*). *Canadian Journal of Chemistry*, 39, 889–896.
- Kubackova, M., Karacsonyi, S., & Bilisics, L. (1992). Structure of galactoglucomannan from *Populus molinifera* H. *Carbohydrate Polymers*, 19, 125–129.
- Lufrano, N. S. P., & Caffini, N. O. (1981). Mucílagos foliares de *Chorisia* H.B.K (Bombacaceae): Analisis fitoquímico y enfoque quimiotaxonomico. *Phyton*, 40, 13–20.
- Meier, H. (1958). Studies on hemicelluloses from pine (*Pinus sylvestris* L.). *Acta Chemica Scandinavica*, 12, 1911–1918.
- Peterson, G. L., et al. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346–356.
- Petkowicz, C. L. O., Sierakowski, M. R., Ganter, J. L. M. S., & Reicher, F. (1998). Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpiniaaceae. *Phytochemistry*, 49(3), 737–743.
- Reid, J. S. G., & Edwards, M. E. (1995). Galactomannans and other cell wall polysaccharides in seeds. In A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 155–186). New York: Marcel Decker, Inc.
- Rizzini, C. T. (1986). *Árvores e Madeiras Úteis do Brasil*. São Paulo: Edgar Blücher, pp. 133–134.
- Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., & Millet, M. A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 37(8), 336–343.
- Sarkanen, K. V., & Hergert, H. L. (1971). *Classification and distribution. Lignins*, Toronto: Wiley-Interscience, pp. 43.
- Sjöström, E. (1993). *Wood chemistry. Fundamentals and applications*. San Diego: Academic Press, Inc, pp. 51.
- Sun, R., Lawther, J. M., & Banks, W. B. (1996). Fractional and characterisation of wheat straw hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 29, 325–331.
- Timell, T. E. (1964). Wood hemicelluloses. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 19, 247–302.
- Timell, T. E. (1965). Galactoglucomannans. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 134–137.
- Tomlinson, P. B. (1992). Aspects of cone morphology and development in Podocarpaceae (Coniferales). *International Journal of Plant Science*, 153(4), 572–588.
- Tyminski, A., & Timell, T. E. (1960). The constitution of a glucomannan from white spruce (*Picea glauca*). *Journal of the American Chemical Society*, 82, 2823–2827.
- Wallace, G., Russell, W. R., Lomax, J. A., Jarvis, M. C., Lapierre, C., & Chesson, A. (1995). Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. *Carbohydrate Research*, 272, 41–53.