

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Clóvis Oliveira Silva

PAPEL DA β -GALACTOSIDASE NO MECANISMO DE
DEGRADAÇÃO DO XILOGLUCANO DE PAREDE
CELULAR DURANTE A MOBILIZAÇÃO DE RESERVA EM
COTILÉDONES DE *Copaifera langsdorffii*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Clóvis Oliveira Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Biologia Celular.

Orientador Dr. Marcos Silveira Buckeridge

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

CHAMADA	T/UNICAMP
SI	38p
EX	
NUMERO DE	48315
16-837102	
REÇO	R\$ 11,00
ATA	17104102
CPD	

MOO166257-9

3 ID 236697

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

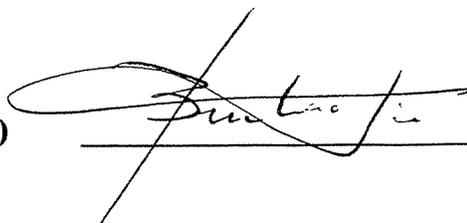
Si38p **Silva, Clóvis Oliveira**
 Papel da β -galactosidase no mecanismo de degradação do xiloglucano de parede celular durante a mobilização de reserva em cotilédones de *Copaifera langsdorffii*/Clóvis Oliveira Silva . --
 Campinas, SP:[s.n.], 2001
 58f.ilus.
 Orientador: Marcos Silveira Buckeridge
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. β -galactosidase. 2. Celulase. 3. Parede celular. 4. Oligossacarídeo. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa 13/12/2001

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (orientador)

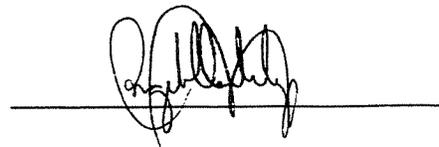


Dra. Sônia Machado de Campos Dietrich



Dr. Paulo Henrique Netto de Alcântara

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo



200215952

DEDICATÓRIA

Não é preciso distinguir tantas espécies de amor quanto os objetos que podemos amar...Um homem honrado por sua esposa e um bom pai por seus filhos

À minha esposa Lúcia

Aos meus filhos Mateus, Marcos e Bruno

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcos Silveira Buckeridge cuja orientação e confiança permitiram a realização desse trabalho.

Aos meus pais pelo exemplo de força e determinação.

Aos amigos Denis Ubeda de Lima e Marco Aurélio Tiné pelos incontáveis auxílios técnicos e pela amizade demonstrada.

Ao Dr. Paulo Henrique Netto de Alcântara pelo empenho e atenção a todas as solicitações.

Ao Professor John S. Grant Reid, do Department of Biological Sciences da University of Stirling, Escócia pela doação da XET de *Tropaeolum majus*.

À Liliana Martim pelo auxílio nas purificações enzimáticas.

Ao técnico Rafael Facina pelas diversas ajudas com o computador.

Aos colegas Clóvis Fernandes, Claudia Alves, Henrique, Minhoto, Ana Maria, Ana Baroni, Lourdes, Kelly, Cesar, Josimara, Marcos Aidar e Marília pelas sugestões e reflexões sobre os resultados obtidos.

Aos demais Colegas e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo auxílio durante as diversas etapas do trabalho.

Ao Departamento de Biologia Celular e Estrutural pela a oportunidade de participar do seu corpo discente.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela oportunidade de estagiar na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

À FAPESP pela a ajuda financeira.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	11
1. A PAREDE CELULAR.....	11
2. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE SEMENTES	12
3. XILOGLUCANOS: ESTRUTURA QUÍMICA E ENZIMAS DE HIDRÓLISE	13
4. ENZIMAS DO CATABOLISMO DOS XILOGLUCANOS	16
4.1-XILOGLUCANO ENDO- β -TRANSGLICOSILASE (XET).....	17
4.2- β -GALACTOSIDASE	19
4.3- α -XILOSIDASE E β -GLUCOSIDASE.....	19
5.MODELOS DE DEGRADAÇÃO DE XILOGLUCANO EM SEMENTES	20
PROPOSIÇÃO DO PROBLEMA E OBJETIVO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
1.MATERIAL VEGETAL.....	27
2.PURIFICAÇÃO DO XILOGLUCANO DE RESERVA DE SEMENTES.....	28
3.OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS DE XILOGLUCANO COM PESOS MOLECULARES MAIORES QUE 10 KDA.....	28
4.OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS DE XILOGLUCANO COM PESOS MOLECULARES MENORES QUE 10 KDA.....	29
5.ISOLAMENTO DA β -GALACTOSIDASE DE COTILÉDONES DE <i>Copaifera langsdorffii</i>	30
6.ISOLAMENTO DA β -GALACTOSIDASE DE COTILÉDONES DE <i>Tropaeolum majus</i>	30
7.OBTENÇÃO DA XET DE <i>Tropaeolum majus</i>	31
8.DOSAGEM DE AÇÚCAR TOTAL.....	31
9.DOSAGEM DE PROTEÍNAS	31
10.QUANTIFICAÇÃO DAS GALACTOSES LIVRES	32
11.ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	32
12.ISOLAMENTO DAS BANDAS F, G E H.....	33
13.DIGESTÃO DAS BANDAS F, G E H.....	33

14. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DE ALTA RESOLUÇÃO-HPAEC-PAD	34
RESULTADOS	35
1. PURIFICAÇÃO DA β-GALACTOSIDASES DE COTILÉDONES DE <i>C. langsdorffii</i> E <i>T. majus</i> ...	35
2. OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DE XILOGLUCANO	38
2.1-FRAGMENTOS OBTIDOS ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA.....	38
2.2-FRAGMENTOS OBTIDOS ATRAVÉS DE FILTRAÇÃO EM GEL	39
3. ATIVIDADES DAS β-GALACTOSIDASES SOBRE OS FRAGMENTOS DE XILOGLUCANO....	40
3.1. ANÁLISE POR GALACTOSE DESIDROGENASE	40
3.2. ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE EM CONJUNTO COM XET SOBRE SUBSTRATO NATURAL	42
DISCUSSÃO.....	48
1. PURIFICAÇÃO DA β-GALACTOSIDASE DE <i>Copaifera langsdorffii</i>.....	48
2. OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE XILOGLUCANO.....	49
3. ATIVIDADE DA β-GALACTOSIDASE SOBRE FRAGMENTOS DE XILOGLUCANO.....	50
4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA XET NA PRESENÇA DE β-GALACTOSIDASE.....	53
CONCLUSÕES.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56

Abreviaturas

CM-celulose – Carboximetil Celulose

C β -gal - β -galactosidase de *Copaifera langsdorffii*

HPAEC-PAD - High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulse Amperometric Detector

DEAE-Celulose – Dietilaminoetil Celulose

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

FPLC –Fast Performance Liquid Chromatography

kDa – kiloDaltons

T β -gal - β -galactosidase de *Tropaeolum majus*

XET – Xiloglucano endo-transglicosilase

RESUMO

Os xiloglucanos são polissacarídeos de parede celular com cadeia principal de glucano ligado $\beta(1\rightarrow4)$ e ramificações de xilose ligadas $\alpha(1\rightarrow6)$ podendo apresentar substituições de galactose ligadas $\beta(1\rightarrow2)$. Este polímero constitui a principal reserva de carbono das sementes de espécies como *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* e *Tropaeolum majus*. Um modelo de degradação do xiloglucano de sementes foi proposto em que o polissacarídeo é atacado pela ação de uma xiloglucano-endo- β -transglicosilase produzindo fragmentos com cadeias repetitivas de 7 a 9 unidades de açúcar (blocos estruturais). Esta degradação parcial possibilita que ocorra a desgalactosilação por uma β -galactosidase específica permitindo que esses fragmentos sejam atacados pela α -xilosidase e β -glucosidase promovendo assim, a desmontagem do polímero durante a mobilização das reservas. Este trabalho teve como principal objetivo investigar a relação entre o tamanho da molécula de xiloglucano e acessibilidade à β -galactosidase. Para isso, foram obtidos através de hidrólise com celulase fúngica, diferentes fragmentos de xiloglucano de 7, 50, 93, 170 e 330 blocos estruturais e também fragmentos de 1, 2, 3 e 4 blocos estruturais, estes últimos demonstram que o xiloglucano de *C. langsdorffii* apresenta essencialmente a mesma estrutura fina que o xiloglucano de *Tamarindus indica* como descrito por Fanutti et al. (1993; 1996) uma vez que os blocos duplos encontrados apresentam-se em proporções e composições similares. O tratamento dos fragmentos de diferentes tamanhos de xiloglucano com as β -galactosidases purificadas de *C. langsdorffii* (C β -gal) e *T. majus* (T β -gal) demonstrou que apenas fragmentos inferiores a 4 blocos são suscetíveis ao ataque das enzimas. Os resultados obtidos demonstram ainda que as duas β -galactosidases são altamente específicas para galactoses adjacentes ao final não redutor das moléculas de xiloglucano (motivos XL). A ação de transglicosilase e hidrólise da XET de *T. majus* é dependente da proporção entre a enzima e o substrato Fanutti et al. (1993; 1996). Neste trabalho porém, os resultados sugerem que a β -galactosidase não pode modular a ação da XET em qualquer atividade que esta apresente em relação ao substrato, sugerindo que durante a mobilização das reservas dos cotilédones, a atividade de uma enzima seja totalmente independente da ação da outra.

ABSTRACT

Xyloglucans are cell wall polysaccharides with a $\beta(1\rightarrow4)$ glucan backbone branched with $\alpha(1\rightarrow6)$ xylose residues and $\alpha(1\rightarrow6)$ xylosyl- $\beta(1\rightarrow2)$ -galactosyl residues. These polymers are the main carbon storage of seeds from some species as *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* and *Tropaeolum majus*. A model of storage xyloglucan degradation was proposed where this polysaccharide is attacked by xyloglucan-endo- β -transglycosylase producing 1,5kDa fragments composed of repeating 7 to 9 monosaccharides residues (structural blocks). This partial degradation allows degalactosylation that occurs by the attack of a specific β -galactosidase, yielding oligosaccharides that are substrates for α -xylosidase and β -glucosidase. The concerted action of these enzymes promotes the complete disassembling of the polymer during the storage mobilisation. The objective of this work was to investigate the relationship between the molecular size of xyloglucan and its accessibility to β -galactosidase. To achieve this goal, fragments with different sizes (1, 2, 3, 4, 7, 50, 93, 170 and 330 structural blocks) were obtained by enzymatic hydrolysis using fungal cellulase. The analysis of fragments of 1 to 4 blocks showed that the fine structure of *C. langsdorffii* is similar to that of *Tamaridus indica* described by Fanutti et al. (1993; 1996), since the small fragments (2 blocks) showed similar proportion and composition. The treatment of xyloglucan fragments with purified β -galactosidase from *C. langsdorffii* (C β -gal) and from *T. majus* (T β -gal) showed that only fragments smaller than 4 blocks were susceptible to the enzymatic attack. The results showed that both β -galactosidases are highly specific to XL motifs at the non-reducing end of xyloglucan fragments. The hydrolytic or transglycolytic activity of *T. majus* XET depends on the substrate concentration (Fanutti et al., 1993). In this work, we showed that the β -galactosidase could not modulate the XET activity on different substrate concentration, suggesting that during the storage mobilisation the enzymes activities are completely independent from each other.

INTRODUÇÃO

1. A Parede Celular

A parede celular é uma estrutura que envolve as células dos vegetais tendo como funções manter a forma da célula, conferir resistência e dar proteção ao protoplasma contido no seu interior. A visão predominante é que a parede celular é uma estrutura espessa com vários papéis fisiológicos em um mundo de funções biológicas (Carpita & Gibeaut, 1993) e portanto pode ser considerada como uma organela celular ativa e dinâmica (Mauseth, 1991). Dois tipos de paredes celulares são encontradas em vegetais superiores: parede celular primária e parede celular secundária.

A parede celular primária é produzida por células em crescimento. Desse modo, estas podem alongar-se ou intumescer-se. Este tipo de parede é composta de microfibrilas de celulose embebidas numa matriz de hemiceluloses, pectinas e uma quantidade muito pequena de proteínas estruturais (Cosgrove, 1999). As microfibrilas são mantidas agrupadas por polissacarídeos da matriz que são denominados hemiceluloses (**Figura 1**). Dentre eles os arabinoxilanos estão presentes na parede primária em monocotiledôneas e são constituídos de uma cadeia linear de resíduos de xilose unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ aos quais se unem resíduos de arabinose e ácido glucurônico. Em paredes primárias de dicotiledôneas, o xiloglucano é o principal componente da hemicelulose. Mais detalhes sobre sua estrutura e função, serão mostrados adiante.

A parede celular secundária por sua vez, corresponde ao material depositado na parede após o crescimento celular. Este tipo de parede, ao contrário da parede primária, não possui a capacidade de alongar-se ou intumescer-se. As paredes secundárias podem fazer

parte do material de reserva e, nesse caso, aparecem em endospermas e cotilédones de sementes.

2. Polissacarídeos de reserva de sementes

As sementes surgiram ao longo da evolução como uma estratégia de dispersão de novos indivíduos. Sua forma e composição química variam em diferentes espécies, de acordo com a estratégia de dispersão da semente, e com o estabelecimento da plântula no ambiente. Estas variações podem ser, por exemplo, na resistência da testa, na quantidade, no tipo e na localização do material de reserva, assim como no grau de desenvolvimento do embrião (Bewley e Black, 1994).

Dentre as substâncias que compõem a semente, encontramos aquelas que formam a sua reserva. Em leguminosas, essas substâncias estão localizadas basicamente em duas estruturas: no endosperma, em sementes albuminosas e nos cotilédones das sementes exalbuminosas. As principais substâncias de reserva acumuladas nas sementes dividem-se em três grupos: os lipídeos, as proteínas e os carboidratos. A ocorrência e a proporção entre estes três grupos de compostos é variável nas sementes de diferentes espécies. Tais compostos são caracterizados como reserva em comparação com outras substâncias presentes na semente, devido à sua degradação e subsequente mobilização dos seus produtos em direção ao eixo embrionário durante a germinação e o estabelecimento da plântula.

Entre os principais carboidratos de reserva em plantas estão o amido e os polissacarídeos de reserva de parede celular. Estes últimos ocorrem principalmente em sementes e podem ser classificados, de acordo com suas estruturas químicas, em mananos,

xiloglucanos e galactanos. Apesar das diferenças marcantes nas estruturas químicas, os polímeros desses três grupos apresentam propriedades físico-químicas semelhantes. Eles possuem em comum a função de reserva, uma vez que são degradados após a germinação da semente e seus produtos são utilizados como fontes de carbono e energia para o crescimento inicial das plântulas. Em cada espécie, apenas um tipo de polímero prevalece como fonte de carbono em grandes quantidades nas paredes celulares, podendo este representar até 40 % ou mais do peso seco da semente (Buckeridge & Dietrich, 1990). Além disso, cada um destes polímeros de parede também desempenha funções secundárias tais como o controle da embebição e distribuição de água nos tecidos das sementes e o controle da expansão celular dos cotilédones (Buckeridge et al. 2000a; Buckeridge et al. 2000b).

3. Xiloglucanos: Estrutura química e enzimas de hidrólise

Os xiloglucanos são polissacarídeos que ocorrem principalmente em paredes celulares de plantas dicotiledôneas. Estes constituem a principal hemicelulose deste grupo de plantas e além disso podem ser acumulados em grandes quantidades em sementes de algumas espécies de Leguminosae-Caesalpinioideae.

Estruturalmente, os xiloglucanos são polímeros compostos por uma cadeia principal celulósica em que resíduos de glucose estão ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. A cadeia principal celulósica pode apresentar 3 tipos de oligossacarídeos ramificados: 1) resíduos de *xilose* apresentam-se como ramificações, ligados ao carbono 6 da glucose através de ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow6)$; 2) o dissacarídeo xilosil $\beta(1\rightarrow2)$ galactose liga-se ao carbono 6 da glucose através de ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow6)$ e 3) o

oligossacarídeo xilosil $\beta(1\rightarrow2)$ galactosil $\alpha(1\rightarrow2)$ fucopirranose liga-se ao carbono 6 da glucose através de ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow6)$, este último característico de parede celular primária e ausente na **Figura 1**.

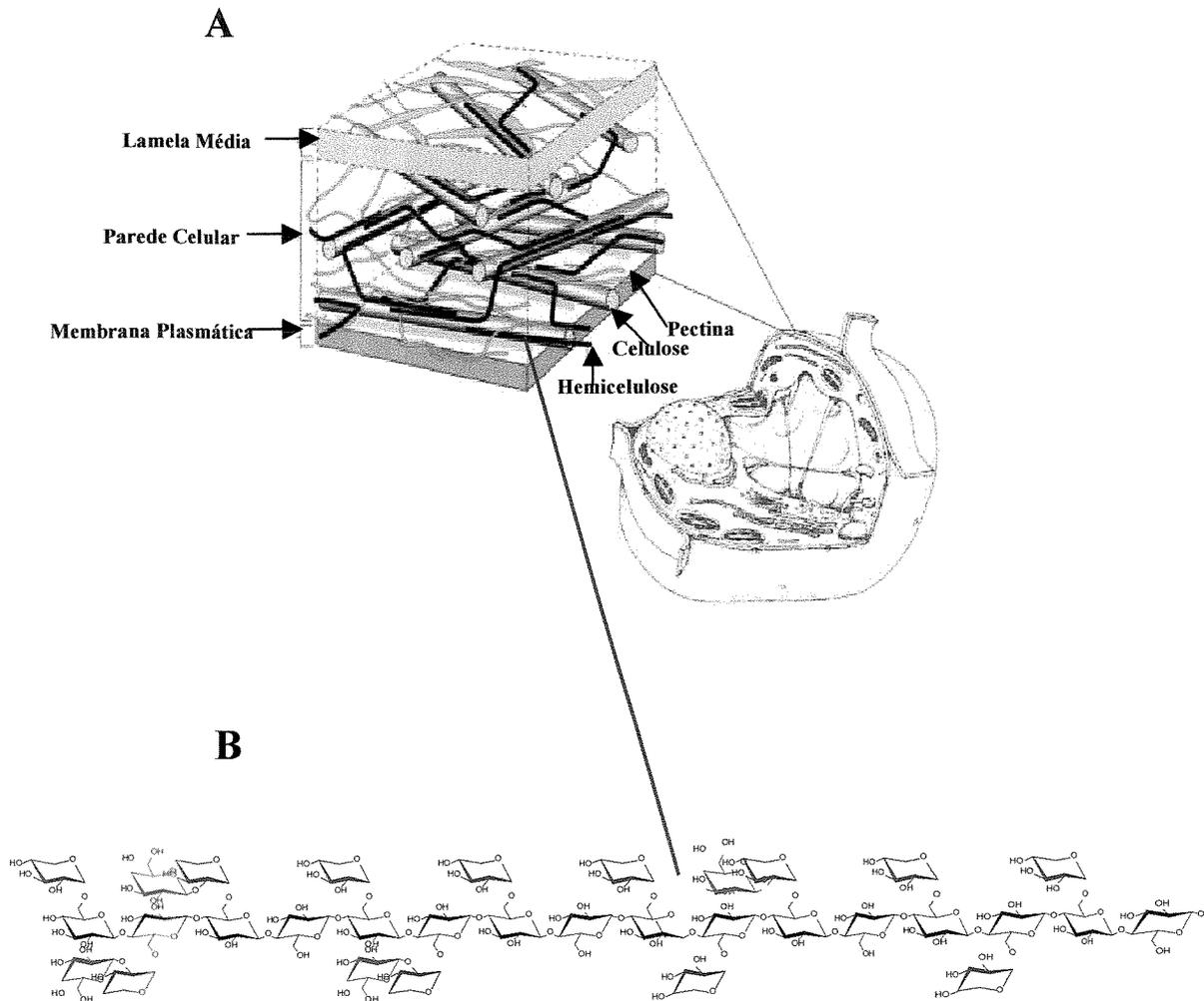


Figura 1. Localização do xiloglucano na célula. A- modelo de célula e de parede celular mostrando os diferentes polímeros da parede e as pontes de hemicelulose entre as microfibrilas de celulose. B- estrutura do xiloglucano de reserva mostrando a cadeia principal de glucose (preto), as ramificações de xilose (azul) e de galactose (vermelho).

A utilização de celulase purificada de *Trichoderma viride* possibilitou estudos mais aprofundados sobre a estrutura fina dos xiloglucanos e hoje se sabe que a maioria dos xiloglucanos conhecidos, inclusive os de reserva, é formada por blocos repetitivos contendo quatro glucoses, três xiloses e zero, uma ou duas moléculas de galactose, uma das quais podendo ainda conter ramificações com resíduos de fucose (Kooiman, 1961, York et al. 1990, Buckeridge et al. 1992). Segundo a nomenclatura atual (Fry et al., 1993), os resíduos não substituídos de glucose são denominados **G**; glucoses ramificadas com xilose são denominadas **X** e em casos onde uma galactose estiver ligada a uma xilose, o trissacarídeo é denominado **L** (Figura 2).

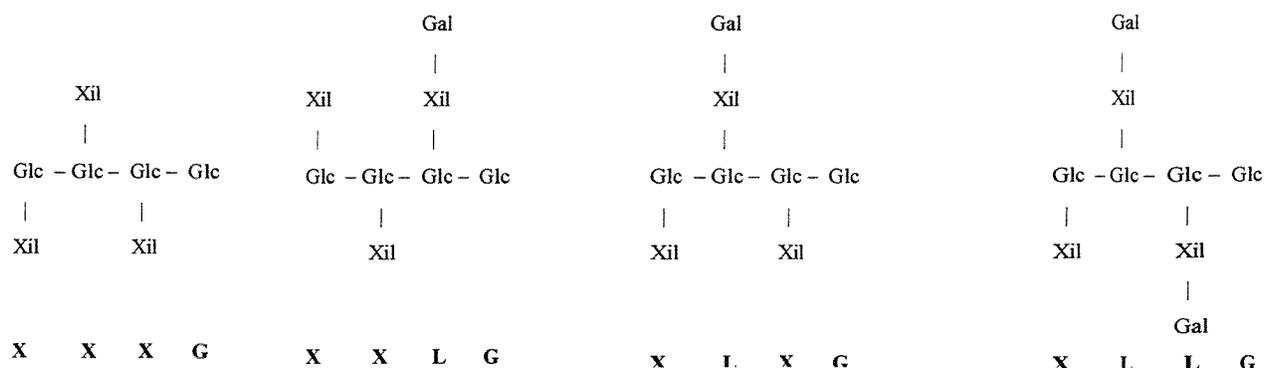


Figura 2. Oligossacarídeos produzidos por hidrólise de xiloglucanos de sementes com celulase de *Trichoderma* sp. Glc=glucose, Xil=xilose, Gal=galactose; chave para a nomenclatura dos oligossacarídeos descritos por Fry et al. (1993): (G=glc, X=glc-xil, L=glc-xil-gal)

Através de cromatografia de camada delgada, Fanuti et al. (1993), identificou dímeros desses blocos, denominando-os como bandas D, E, F, G e H, onde cada banda representa diferentes tipos de combinações dos blocos estruturais de xiloglucano em *Tamarindus indica*.

Acredita-se que uma das funções principais do xiloglucano nas paredes celulares seja coordenar a organização das microfibrilas de celulose. São evidências em favor dessa hipótese os fatos de que 1) os xiloglucanos interagem especificamente com celulose *in vitro* (Hayashi et al. 1994); 2) quando extraídos de paredes intactas deixam uma rede desorganizada de microfibrilas (McCann & Roberts, 1991) e 3) quando adicionados a suspensões de celulose promovem o alinhamento das microfibrilas *in vitro* (Whitney et al. 1995). Como consequência, o controle da forma celular pode estar em grande parte associado com o domínio celulose-xiloglucano em paredes celulares de dicotiledôneas.

A compreensão das funções do xiloglucano tem implicações tecnológicas relevantes na indústria de papel e tecidos, pois em ambos os casos a qualidade de seus produtos pode variar conforme as características do domínio celulose-hemicelulose.

4. Enzimas do catabolismo dos xiloglucanos

Até o momento, 4 enzimas capazes de hidrolisar xiloglucano de reserva foram detectadas em plantas: *xiloglucano endo- β -transglicosilase (XET)*, *β -galactosidase*, *α -xylosidase* e *β -glucosidase*

4.1-Xiloglucano endo- β -transglicosilase (XET)

Esta enzima apresenta certa similaridade com as celulases, que são endo-enzimas capazes de hidrolisar moléculas de celulose ou xiloglucano produzindo fragmentos de menor peso molecular. Se efetuada hidrólise exaustiva, a celulase de *Trichoderma viride* produzirá uma mistura de oligossacarídeos que representam os blocos constitutivos da maioria dos xiloglucanos (**Figura 2**).

Em 1986, Edwards et al., isolaram uma *endo- β -(1,4)-glucanase* de sementes de chagas (*Tropaeolum majus*) e demonstraram que esta enzima é extremamente específica para xiloglucanos. Trabalhos posteriores demonstraram que a estrutura da endo-glucanase é extremamente rara, pois não contém α -hélice e possui 66% de dobras beta nas moléculas (Fanutti et al., 1993). Estas características tornam a molécula protéica extremamente compacta, diminuindo o peso molecular aparente (19 kDa), calculado por filtração em gel (estrutura nativa), em relação ao peso molecular baseado na seqüência de amino ácidos (35 kDa). Fanutti et al. (1993) demonstraram que a enzima XET apresenta duas formas de ação: uma ação transglicolítica e outra hidrolítica. O predomínio de um ou outro tipo de atividade da enzima irá depender das proporções entre a enzima e o substrato. Quando a concentração de substrato é alta, a ação da enzima é predominantemente de transglicosilação, ou seja, a enzima pode transferir blocos resultantes de hidrólise para outros blocos, construindo moléculas de maior peso molecular. Por sua vez, quando houver uma baixa disponibilidade do substrato, a enzima atua como uma hidrolase, produzindo oligossacarídeos.

Acredita-se que a transglicosilação seja de extrema importância durante o crescimento, pois a quebra e conseqüente reconstrução de ligações da cadeia principal de xiloglucanos na parede celular poderia afetar a orientação das microfibrilas de celulose na parede primária, alterando conseqüentemente o crescimento celular (Nishitani & Tominaga, 1991).

No entanto, a função da transglicosilação nas sementes ainda é desconhecida. Este fenômeno nunca foi demonstrado ocorrer *in vivo* em sementes, mas evidências indiretas foram obtidas por Alcântara et al. (1999) de que a transglicosilação de fragmentos de xiloglucano pode ocorrer em cotilédones de sementes de *Copaifera langsdorffii* durante a mobilização do xiloglucano. A atividade de endo-glucanase foi detectada em sementes de espécies brasileiras como *Copaifera langsdorffii* (Buckeridge et al, 1992) , mas além da enzima de *Tropaeolum majus* (Edwards et al 1986), nenhuma outra foi isolada e caracterizada até o momento.

Resultados recentes obtidos por Tiné et al. (2000) e por Alcântara (2000) demonstram que em cotilédones de *Hymenaea courbaril*, a XET detectada atuou apenas como transglicosilase e não como hidrolase. O último autor demonstrou que a XET semi-purificada é capaz de transferir oligossacarídeos de xiloglucano com peso molecular médio de 1,5 kDa para polissacarídeos com peso molecular acima de 6000 kDa. Quando esse fenômeno ocorre, a transferência provoca consistente diminuição do peso molecular médio do polímero.

Com base nesses resultados, bem como nos resultados obtidos por Fanuti et al. (1991; 1993), é possível sugerir que o processo de transglicosilação seja fundamental na mobilização do xiloglucano.

4.2- β -galactosidase

Uma busca nos bancos de dados mostra que um número enorme de β -galactosidases já foi estudado (em julho de 2001, por exemplo, no site do NCBI havia mais de 1370 chamadas). No entanto, β -galactosidases que têm alta especificidade sobre xiloglucano foram isoladas apenas de sementes de *Tropaeolum majus* (Edwards et al., 1988) e de *Copaifera langsdorffii* (Alcântara et al., 1999). Uma diferença importante entre estas duas enzimas é que segundo Edwards et al. (1988), a primeira é capaz de retirar todas as galactoses, tanto do polímero quanto dos oligômeros. No entanto, não conseguimos repetir esse experimento em nosso laboratório e além disso a β -galactosidase de *T. majus* agiu muito mais rapidamente sobre os oligossacarídeos XLXG e XLLG, produzindo uma mistura de XXLG e XXXG, que lentamente foi transformada em apenas XXXG. A β -galactosidase de *C. langsdorffii* não apresenta qualquer ação sobre o polímero de xiloglucano e é extremamente ativa sobre oligossacarídeos, agindo exclusivamente sobre a galactose do final não redutor dos oligossacarídeos (XLXG e XLLG).

4.3- α -xilosidase e β -glucosidase

As únicas α -xilosidases isoladas e caracterizadas como sendo específicas para xiloglucanos foram as enzimas de *Tropaeolum majus* (Fanutti, et al., 1991) e de *Brassica oleracea* (Sampedro et al. 2001). Esta enzima não age sobre o polímero, mas somente sobre os oligossacarídeos produzidos através de hidrólise pela endo-glucanase. A α -xilosidase retira uma xilose de cada vez dos oligossacarídeos XLLG, XLXG, XXLG ou XXXG e tem

que agir em conjunto com uma β -glucosidase (Crombie et al. 1998), onde xilose e glucose são retiradas alternadamente do final não redutor da molécula de cada oligossacarídeo.

O trabalho publicado por Crombie et al. (1998), aprofundou ainda mais os estudos sobre as exo-enzimas do sistema de *Tropaeolum majus*. Esses autores isolaram uma β -glucosidase específica para oligossacarídeos de xiloglucano e verificaram que esta só é capaz de atacar a glucose do terminal não redutor de um oligossacarídeo após a retirada da xilose pela α -xilosidase e além disso, se o oligossacarídeo substrato contiver uma galactose adjacente à xilose na extremidade não redutora do oligossacarídeo (p.ex. XLXG) a β -glucosidase não hidrolisa a glucose, mesmo após a retirada da xilose. De acordo com o apresentado anteriormente, é importante destacar dois fatos de relevância fundamental para o presente trabalho:

- 1) Em nossos experimentos ambas β -galactosidases (*C. langsdorffii* e *T. majus*) só atacam oligossacarídeos, não sendo portanto capazes de atacar o polímero de xiloglucano. No entanto, não se sabe qual o tamanho máximo suscetível dos fragmentos de xiloglucano;
- 2) Nenhuma das duas β -galactosidases mencionadas é capaz de atacar seus respectivos substratos se estes não possuírem as ramificações de galactose na extremidade não redutora da molécula (XLXG ou XLLG).

5. Modelos de degradação de xiloglucano em sementes

Buckeridge e Reid (1996) propuseram um modelo de degradação do xiloglucano para as sementes de *T. majus* (Figura 3). Segundo este modelo, a XET seria a primeira enzima a atuar sobre o polímero, produzindo fragmentos que serão atacados pelas outras hidrolases.

As galactoses seriam retiradas pela β -galactosidase, e os resíduos de xilose e glucose seriam hidrolisados pela α -xilosidase e β -glucosidase, respectivamente.

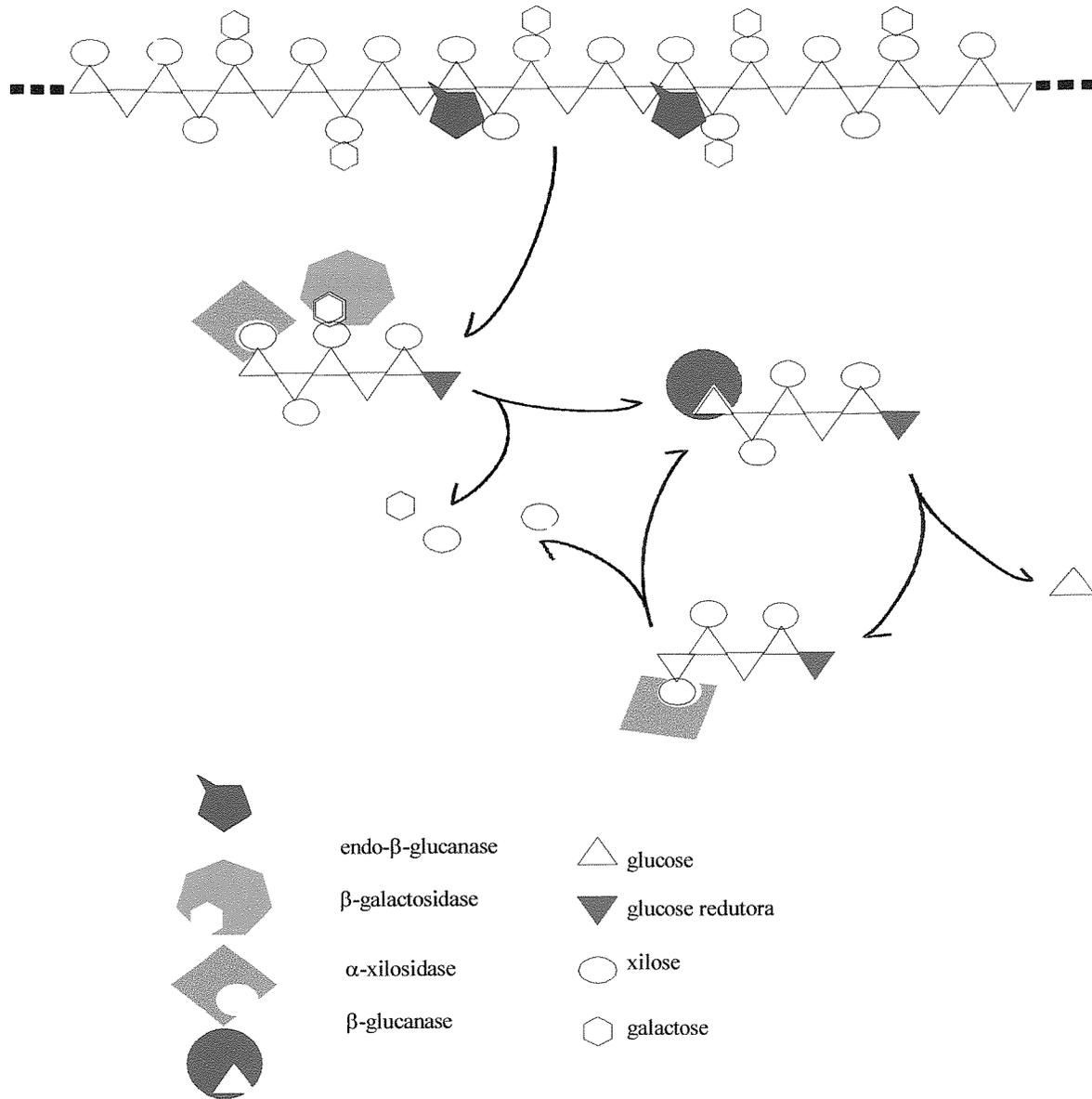


Figura 3. Modelo de degradação de xiloglucano de reserva proposto por Buckeridge e Reid (1996) segundo o esquema de Tiné (1997).

Posteriormente, estudos foram feitos em sementes de leguminosas tropicais (*Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea courbaril*) que justificam algumas alterações importantes neste modelo.

Tiné et. al. (2000) estudaram o sistema de mobilização de xiloglucano em cotilédones de jatobá (*Hymenaea courbaril*). Foram detectadas atividades de β -galactosidase, α -xilosidase, β -glucosidase e XET. Um estudo das condições ótimas para a ação destas enzimas sobre seus respectivos substratos revelou que a β -galactosidase neste sistema possui pH ótimo não coincidente com as demais. A β -galactosidase apresentou um pH ótimo de 3,2 enquanto as demais enzimas apresentaram 4,5 de pH ótimo, o que sugere que esta enzima poderia ser limitante no processo de degradação do xiloglucano.

A atividade de XET foi verificada pela queda viscosimétrica, ou seja, atividade hidrolítica, quando em ensaio de xiloglucano com extratos enzimáticos brutos de jatobá. A queda da viscosidade só pôde ser obtida com extratos brutos quando oligossacarídeos de xiloglucano foram adicionados ao meio de incubação (Tiné et al., 2000). Uma diferença importante em relação ao sistema de *Tropaeolum majus* é que em jatobá não há praticamente atividade de endo- β -glucanase, mas somente XET.

A atividade transglicolítica da XET de *H. courbaril* pôde ser verificada através da incubação do extrato enzimático em um meio de reação contendo oligossacarídeo e polissacarídeo, utilizando cromatografia de filtração em gel para a análise dos produtos (Alcântara, 2000). Os resultados sugerem que os oligossacarídeos de menor peso molecular são transferidos para o polímero, diminuindo seu peso molecular por uma sucessão de transferências onde os oligossacarídeos menores são doadores e os maiores são aceptores. O esquema a seguir exemplifica tal processo:

Paralelamente aos estudos com a XET, Alcântara et al. (1999) purificaram uma β -galactosidase de cotilédones de *Copaifera langsdorffii* e verificaram que sua variação durante o crescimento inicial da plântula indica fortemente que ela está relacionada à mobilização do xiloglucano. Porém esses autores demonstraram que a β -galactosidase isolada não é capaz de atacar o polímero de xiloglucano, mas somente oligossacarídeos. Mais do que isso, demonstraram que ela só ataca as galactoses próximas ao terminal não redutor da molécula (XLLG e XLXG) ou combinações de blocos que tenham um dos blocos citados na extremidade não redutora.

Apesar das informações estarem sendo obtidas de diferentes sistemas (*T. majus*, *C. langsdorffii* e *H. courbaril*), torna-se cada vez mais claro que a β -galactosidase tem um papel crucial na desmontagem final dos oligômeros de xiloglucano em todos esses sistemas.

Assim, com base nestes resultados recentemente publicados, foi proposto um modelo tentativo de desmontagem de polímeros de xiloglucanos de sementes (**Figura 4**). Este modelo incluiria três fases a serem descritas abaixo:

- 1) Desmontagem parcial por ação da XET, provocando uma diminuição considerável no peso molecular médio do xiloglucano;
- 2) Desgalactosilação (pela ação controlada da β -galactosidase) dos fragmentos obtidos por transglicosilação, tornando os oligossacarídeos suscetíveis à ação das outras exo-hidrolases;
- 3) Desmontagem final dos oligossacarídeos desgalactosilados, pela ação conjunta da α -xilosidase e β -glucosidase, produzindo monossacarídeos livres.

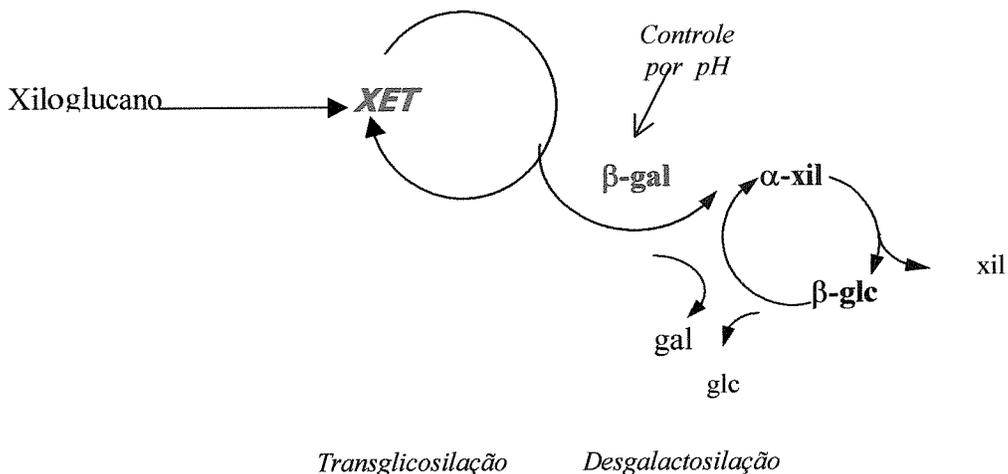


Figura 4. Modelo proposto por Tiné et al. (2000) para a desmontagem “in vivo” do xiloglucano de reserva em sementes. O polissacarídeo é parcialmente hidrolisado pela XET, a qual passa a efetuar transglicosilação quando o peso molecular diminui. Somente quando certos resíduos de galactose em XLXG e XLLG eram hidrolisados (desgalactosilação), os oligossacarídeos remanescentes dos fragmentos maiores contendo XXLG e XXXG entrariam no ciclo final de desmontagem na qual a glucose e a xilose seriam atacadas pela β -glucosidase e α -xilosidase para produzir monossacarídeos livres.

As características das β -galactosidasas de Leguminosae relacionadas à mobilização do xiloglucano sugerem que elas podem desempenhar, junto com a XET, um papel de controle na degradação do xiloglucano de reserva. Além da capacidade de reconhecer posições específicas das moléculas de oligossacarídeos, como a β -galactosidase de *C. langsdorffii* que hidrolisa apenas resíduos de galactose do XLLG e XLXG não atuando sobre XXLG (Alcântara et al. 1999), a liberação dos demais resíduos de monossacarídeos não pode continuar sem a remoção da galactose (Crombie et al. 1998). A caracterização da enzima de

C. langsdorffii também mostrou um pH ótimo de 3,2, o qual é inferior ao das outras hidrolases do xiloglucano, que se situam em pH 4,5 (Alcântara et al. 1999).

Para aprofundar, há ainda algumas perguntas fundamentais a serem respondidas. Entre elas está a pergunta proposta para esse trabalho:

Proposição do problema e objetivo

Considerando que o polímero de xiloglucano não é atacado pela β -galactosidase e que esta ataca somente os oligossacarídeos, deve existir um tamanho máximo dos fragmentos de xiloglucano acessível ao ataque da β -galactosidase, marcando o término da fase de transglicosilação e dando condições de ser iniciada a fase de desgalactosilação que, ao terminar, culmina na fase de desmontagem. Por outro lado, o fato da XET apresentar modos distintos de ação sobre o substrato (hidrólise ou transglicosilação) torna importante a ação interativa entre essas enzimas relacionadas ao metabolismo do xiloglucano. Isto posto o presente trabalho teve como objetivo determinar o tamanho máximo de acessibilidade de fragmentos de xiloglucano à β -galactosidase xiloglucano específica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Vegetal

Foram empregadas sementes de *C. langsdorffii* coletadas de espécimes existentes na mata do Jardim Botânico de São Paulo para o isolamento da β -galactosidase e do xiloglucano de reserva.

Isolamento da C β -gal- As sementes de *C. langsdorffii* foram escarificadas por abrasão da casca com lixa de papel, desinfetadas por imersão em solução a 10% de hipoclorito de sódio por 5 minutos, lavadas em água corrente e postas em bandejas forradas com papel de filtro e água destilada em sala de crescimento com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. A medida que as sementes germinavam, elas eram plantadas em vasos que permaneciam em sala de crescimento com temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas até o momento da coleta dos cotilédones, que coincidiu com a o período do ápice da atividade da β -galactosidase que era de cerca de 30 dias após o início da embebição, (Alcântara et al., 1999).

Isolamento da T β -gal- Foram empregadas sementes de *T. majus* importadas da Dinamarca pela empresa Feltrim Importadora de sementes Ltda. As sementes foram embebidas em água destilada por 12 horas, semeadas em bandejas com vermiculita e mantidas em sala de crescimento com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Para o preparo do extrato bruto os cotilédones foram coletados no décimo terceiro dia após o início da embebição, período esse coincidente com o pico de atividade da β -galactosidase conforme descrito por Edwards et al., 1985.

2.Purificação do xiloglucano de reserva de sementes de *C. Langsdorffii*

As sementes de *C. langsdorffii* foram fervidas para soltar a casca e posteriormente descascadas, secas a 60°C e moídas. Ao pó resultante, foi adicionada água destilada (100 ml/g de pó) e a suspensão foi mantida a 80°C com agitação contínua durante 6 horas. Após a extração em água quente, o material foi filtrado e a este foram adicionados 3 volumes de etanol para precipitação do xiloglucano. Procedida então nova filtração para separação do xiloglucano, o precipitado foi lavado com etanol e acetona e depois seco à temperatura ambiente. O material seco foi resolubilizado com auxílio de homogeneizador da marca Ultra Turrax em volume mínimo de água destilada, centrifugado (para retirar impurezas), congelado e liofilizado. O pó das sementes de *C. langsdorffii* rendeu em média 40 % de xiloglucano. O grau de pureza, medido pelo teor de açúcares totais por massa seca foi de 99,6%.

3.Obtenção de fragmentos de xiloglucano com pesos moleculares maiores que 10 kDa

A obtenção dos fragmentos de xiloglucano de *C. langsdorffii* se deu através um sistema de reação composto por 13 ml de uma solução 0,1% (p/v) do polissacarídeo e 13 ml de tampão McIlvaine 50 mM pH 5,2. Ao sistema foram adicionadas 0,2 U de endoglucanase de *Trichoderma* sp (Megazyme) em dois tempos de incubação (0,5 e 15 minutos) a 30°C. A separação dos fragmentos de diferentes pesos moleculares resultantes da hidrólise foi realizada por filtração em gel do material hidrolisado (Sephacrose 6B calibrada com padrões de dextrano–Sigma). A eluição feita com o mesmo tampão, sendo coletadas amostras de 1,8 ml e a detecção dos fragmentos foi feita através da dosagem de açúcares totais (Dubois et al., 1956). Com base na eluição destes fragmentos em relação aos

tempos de incubação, pôde-se estimar os tempos de hidrólise para a obtenção dos diferentes tamanhos de fragmentos de xiloglucano.

4.Obtenção de fragmentos de xiloglucano com pesos moleculares menores que 10 kDa

A obtenção dos fragmentos de xiloglucano de *C. langsdorffii* se deu através da hidrólise enzimática de 50 ml de xiloglucano (solução de 1%) tratada com endoglucanase de *Trichoderma* sp (0,5 U) e 2 ml de acetato de amônio 1 M, pH 5,0 por um período de 48 horas a 30°C.

Após hidrólise, foi possível a obtenção de fragmentos com baixos pesos moleculares através de precipitação etanólica fracionada seguida por centrifugações. À solução inicial contendo fragmentos de xiloglucano, foram adicionados dois volumes de etanol PA (Sigma-Aldrich). e o sistema foi centrifugado a 10000g por 15 minutos. O precipitado foi ressolubilizado em água destilada e ao sobrenadante foi adicionado mais um volume de etanol (total de 3 volumes) e repetida a centrifugação como anteriormente. Tal procedimento foi repetido adicionando mais 2 volumes de etanol (para um total de 5 volumes) e mais um volume (total de 6 volumes). O precipitado final foi seco em evaporador rotatório (HETOVAC) e ressolubilizado em água destilada. As frações dos diferentes volumes de etanol foram evaporadas, ressuspendidas e analisadas por HPAEC-PAD e CCD para a determinação do tamanho dos blocos estruturais obtidos.

5. Isolamento da β -galactosidase de cotilédones de *Copaifera langsdorffii*

A β -galactosidase de *C. langsdorffii* (C β -gal) foi purificada por cromatografias de troca aniônica (DEAE-cellulose/Sigma) e catiônica (CM-celulose/Sigma) e Bio-Gel P-60 (Bio-Rad, EUA) e a atividade da β -galactosidase foi monitorada com PNP- β -D-galactopiranosídeo conforme descrito por Alcântara et al.(1999).

6. Isolamento da β -galactosidase de cotilédones de *Tropaeolum majus*

A purificação da β -galactosidase de *T. majus* (T β -gal) foi baseada em método descrito por Edwards et al. (1988) com algumas adaptações para FPLC (Akta-Pharmacia). Cotilédones de plântulas com 12 dias após o início da embebição foram utilizados para o preparo do extrato enzimático. Este foi submetido à cromatografia de troca aniônica (DEAE-celulose/Sigma). O volume coletado de 30 mL contendo atividade de β -galactosidase foi aplicado em coluna de troca catiônica (Mono S, Pharmacia) em um total de 15 injeções de 2 mL. Após a coleta de frações de 1 mL, as atividades de β -galactosidase, α -xilosidase e β -glucosidase foram determinadas. Uma nova passagem em Mono S obedecendo o procedimento anterior, foi realizada com todas as frações que apresentaram o pico de atividade da β -galactosidase, com correspondente baixa atividade das outras hidrolases. As frações contendo alta atividade de β -galactosidase de *T. majus* foram armazenados a -20°C para posterior utilização em experimentos de hidrólise de oligossacarídeos e polissacarídeos.

7.Obtenção da XET de *Tropaeolum majus*

Esta enzima foi gentilmente doada pelo Professor John S. Grant Reid, do Department of Biological Sciences da University of Stirling, Escócia. A enzima, segundo o professor Reid, foi preparada exatamente como em seu trabalho original (Edwards et al. 1986).

8.Dosagem de açúcar total

A dosagem de açúcar total das frações obtidas por cromatografias de filtração em gel foi feita pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). Em tubos de vidro foram colocadas uma alíquota da amostra a ser dosada, água para um volume de 500 μ L, 500 μ L de fenol (5% em água) e 2,5 mL de ácido sulfúrico PA, nessa ordem, com homogeneização vigorosa após a adição de cada componente. O sistema foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos antes da leitura da absorbância a 490 nm. A quantificação de açúcar foi feita comparando os valores obtidos com os de uma curva padrão de glucose de 60 a 500 μ g.

9.Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteína das frações das cromatografias dos extratos enzimáticos foi estimado pela leitura da absorbância a 280 nm, em espectrofotômetro da série UV- 1201 (Spectroscopic Instruments Division, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As quantidades de proteína nos extratos foram determinadas por reação com Coomassie Blue e posterior leitura da absorbância a 595 nm utilizando uma curva padrão soroalbumina bovina de acordo com metodologia descrita por Bradford (1976).

10. Quantificação das galactoses livres

A quantificação das galactoses liberadas pela ação das β -galactosidases foi feita enzimaticamente (galactose desidrogenase-Kurz & Wallenfels, 1974). Inicialmente, 190 μ g de amostra (fragmentos de xiloglucano) foram incubados com 50 μ L de enzima, 10 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 por 20 horas a 30°C, para a liberação da galactose pela ação das β -galactopsidases. Em seguida foi feita uma segunda incubação para determinar o conteúdo de galactose liberado utilizando-se 200 μ l de tampão tris-HCl 20 mM pH 7,8, 20 μ L de galactose desidrogenase e 30 μ L de NAD. A quantidade de galactose liberada foi determinada pela leitura da absorbância a 340 nm utilizando uma curva padrão de 0,25 a 1 mM de galactose.

11. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os fragmentos de xiloglucano menores que 10 kDa obtidos por hidrólise com celulase, bem como os produtos da ação da β -galactosidase e da XET sobre estes foram analisados por cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel F60 (Schleicher e Schuell) com 5 mm de distância entre os pontos de aplicação das amostras e 10 mm das bordas. Foram realizadas três corridas ascendentes para ambos os casos em uma solução composta por butanol-1:nitrometano:água (5:2:3) e a revelação foi feita aspergindo sobre a placa ácido sulfúrico 5% em etanol e aquecendo-a em seguida a 120°C.

12. Isolamento das bandas F, G e H

Para o isolamento das bandas F, G e H, (descrita por Fanuti et al., 1993), foi corrida uma placa preparativa em CCD com 3 mL de uma solução de oligossacarídeos a 1% e apenas as extremidades foram reveladas. As faixas relativas aos oligossacarídeos desejados foram raspadas da placa e a sílica foi colocada em água deionizada, mantida a 30°C por 30 minutos para solubilização dos oligossacarídeos. A sílica insolúvel foi separada por centrifugação e a solução de oligossacarídeos do sobrenadante foi seca e dissolvida em 1 mL de água deionizada e o açúcar total foi quantificado.

13. Digestão das bandas F, G e H

A digestão das bandas F, G e H foi realizada segundo protocolo descrito por Fanutti et al. (1993). Amostras contendo uma solução 0,3 mM e 3,0 mM de cada substrato foram incubadas por 20 horas a 30°C em três tratamentos: 1) com a XET e a C β -gal; 2) com XET apenas e 3) apenas com C β -gal. Em uma outra ocasião, foram realizados ensaios utilizando a T β -gal nas mesmas condições acima descritas. As amostras do sistema de reação continham 30 μ L de substrato, XET de *T. majus* (0,4U), 10 μ L de β -galactosidase (478,37 μ mol.min⁻¹.mL⁻¹) purificada e tampão acetato de amônio 50 mM pH 5,0 qsp 60 μ L, sendo o controle composto apenas pelo substrato e o tampão. Os oligossacarídeos modificados produzidos pelas hidrólises foram analisados por HPAEC-PAD e CCD para a determinação do modo de ataque das enzimas (β -galactosidase e XET) quando estas agem juntas ou separadamente sobre os diferentes substratos.

14. Análise por cromatografia de troca iônica de alta resolução–HPAEC-PAD

Os fragmentos de xiloglucano obtidos por hidrólise com celulase, bem como os produtos da ação da β -galactosidase e da XET sobre estes, também foram analisados por cromatografia de troca aniônica (HPAEC-PAD) utilizando sistema Dionex (DX-500). Empregou-se o sistema de troca iônica, separando-se a mistura de oligossacarídeos por gradiente de acetato de sódio (35 a 75 mM) em hidróxido de sódio (88 mM), com fluxo de 0,9 ml/min usando uma coluna Carbo Pac PA100.

RESULTADOS

1. Purificação das β -galactosidases de cotilédones de *C. langsdorffii* e *T. majus*

A etapa inicial deste trabalho consistiu na purificação das β -galactosidases de cotilédones de *C. langsdorffii* e *T. majus*. Os resultados mostrados são referentes à purificação da β -galactosidase de *T. majus*, uma vez que, a purificação de β -galactosidase de *C. langsdorffii* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Alcântara et al. (1999), obtendo os mesmos resultados mostrados por estes autores.

A β -galactosidase do extrato dos cotilédones de *T. majus* não foi retida na coluna de DEAE-celulose em tampão tris-HCl 20 mM pH 7,8 e o pico de atividade da enzima correspondeu ao pico de proteínas das frações (**Figura 5A**). As frações pertencentes ao pico de atividade de β -galactosidase foram reunidas e aplicadas em coluna de troca catiônica, sendo posteriormente eluídas com um gradiente de 0 a 0,5M de NaCl. Durante este procedimento, foi detectada apenas atividade de α -xilosidase e traços de β -glucosidase como contaminantes. A atividade de β -galactosidase formou dois picos distintos, sendo que as frações referentes ao 14^o e 15^o mL (**Figura 5B**) foram coincidentes com o pico de eluição de proteína, apresentando baixa atividade de α -xilosidase e nenhuma atividade de β -glucosidase. A separação da atividade da β -galactosidase das outras hidrolases contaminantes (**Figura 5C**), só foi possível após uma reaplicação das frações (14 e 15) e eluição com um gradiente de NaCl (0 a 0,3M).

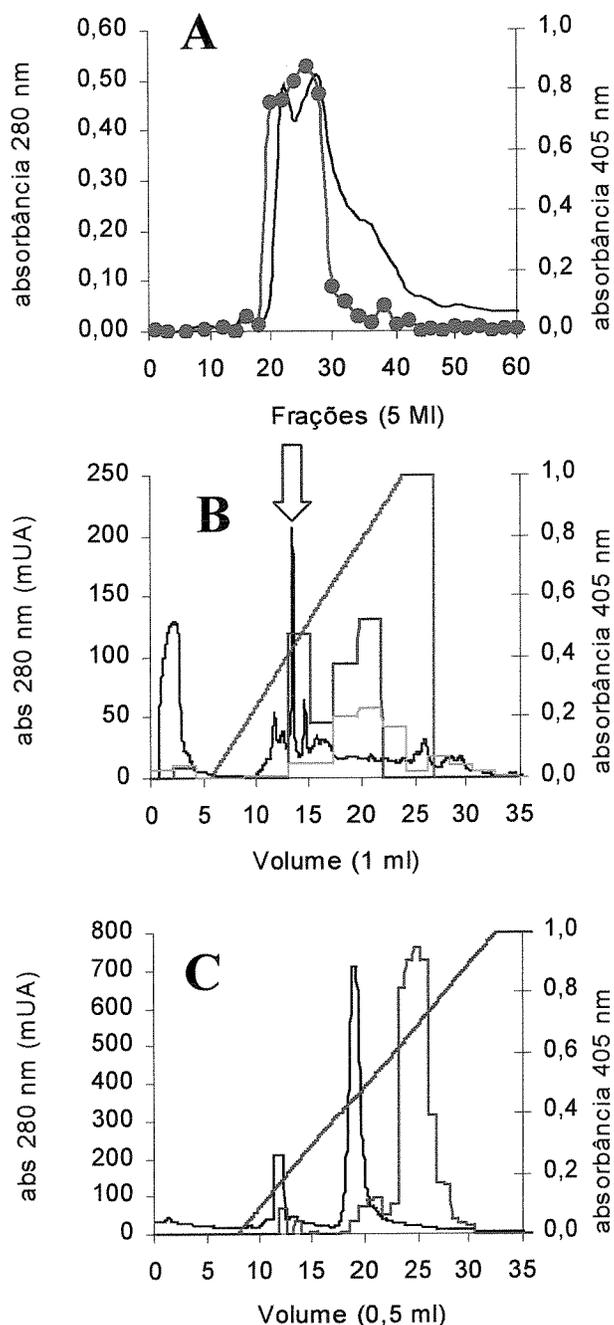


Figura 5. Etapas da purificação da β -galactosidase de cotilédones de *T. majus* utilizando cromatografias de troca iônica adaptadas a um sistema automático de baixa pressão (FPLC-Akta Purifier – Amershan Pharmacia). Linha preta, eluição de proteínas em leitura 280 nm; linha vermelha, β -galactosidase, linha verde, α -xilosidase (x10); linha azul escuro, gradiente de NaCl. (A): DEAE-celulose, (B): Mono S, (C): reinjeção em Mono S, (\Downarrow) Fração reaplicada, frações 5, 1 e 0,5 mL respectivamente.

Os resultados referentes ao processo de purificação da β -galactosidase estão representados na **Tabela 1**. A enzima foi purificada 387 vezes com um rendimento de 3,2 %, sendo que o processo de reinjeção na coluna Mono S foi a principal etapa de purificação, considerando a eliminação da contaminação com as outras glicosidases do sistema. Foi também a etapa que apresentou a maior perda de rendimento, pois desconsiderou-se o pico maior de atividade da primeira passagem por mono S.

Tabela 1. Tabela de purificação da β -galactosidase de cotilédones de *T. majus* em FPLC

Etapa	Vol. total (mL)	Proteína (mg)	Atividade específica ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	352	404,45	0,70	-	100
$[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ 90%	75	85,05	19,93	28,5	596,9
DEAE-celulose	30	2,52	114,84	164,1	101,9
Mono S	25	0,27	224,44	320,6	21,7
Mono S (reinjeção)	2	0,03	270,99	387,1	3,2

2. Obtenção e análise dos fragmentos de xiloglucano

2.1-Fragmentos obtidos através de precipitação etanólica

Utilizando xiloglucano (hidrolizado enzimaticamente (1%) , foi possível a obtenção de fragmentos com baixos pesos moleculares (menores que 10 kDa) através de precipitação etanólica fracionada seguida por centrifugações (ver metodologia descrita anteriormente). Observa-se na **Figura 6** que a metodologia utilizando precipitação alcoólica apresentou uma eficiente separação dos oligossacarídeos de até 4 blocos estruturais, principalmente dos materiais precipitados em 6 volumes (fração rica em fragmentos com 2 blocos), bem como o material solúvel (sobrenadante), rico em monômeros. Fragmentos constituídos por mais de 3 blocos podem ser precipitados com 2 ou 3 volumes de etanol, e a precipitação utilizando 5 volumes resulta num material rico em fragmentos com 2 e 3 blocos estruturais (na mesma proporção).



Figura 6. Análise por cromatografia de camada delgada dos fragmentos de xiloglucano obtidos por hidrólise com celulase seguida de precipitação com diferentes volumes (v) de etanol (2v, 3v, 5v e 6v); Sob 6v (sobrenadante da precipitação em 6v) e XGOS (oligossacarídeos de xiloglucano obtidos por hidrólise enzimática sem precipitação etanólica). F1 (fragmentos com 1 bloco estrutural), F2 (fragmentos com 2 blocos estruturais) e F3 (fragmentos com 3 blocos estruturais). As bandas que aparecem abaixo de F3 representam fragmentos com mais de 4 blocos estruturais. O=origem

2.2-Fragmentos obtidos através de filtração em gel

Com o objetivo de obter fragmentos de xiloglucano formados entre 7 e 330 blocos (10 a 500kDa), utilizou-se uma metodologia de hidrólise enzimática parcial e cromatografia de filtração em gel. Os fragmentos obtidos por hidrólise durante 0, 5, 15 e 60 minutos de incubação foram submetidos a filtração em gel (Sepharose 6B calibrada com padrões de dextrano–Sigma) (**Figura 7**). Com base na eluição destes fragmentos em relação aos tempos de incubação, pôde-se estimar os tempos de hidrólise para a obtenção dos diferentes tamanhos de fragmentos de xiloglucano. Desta forma obtiveram-se fragmentos com cerca de 7, 50, 93, 170 e 330 blocos estruturais.

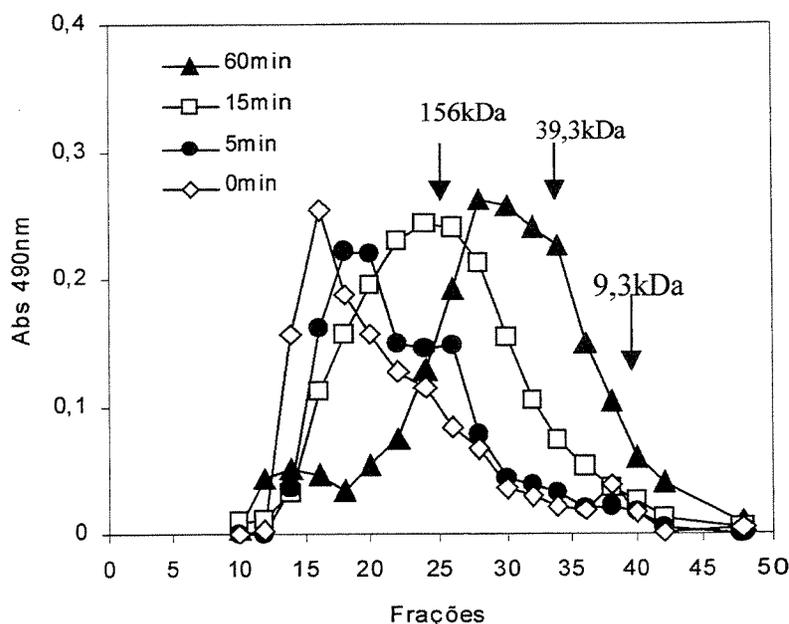


Figura 7. Filtração em gel (Sephacose 6B) dos fragmentos obtidos após hidrólise com celulase (*Trichoderma* sp–Megazyme) após 0, 5, 15 e 60 minutos de incubação. As setas indicam os padrões de pesos moleculares (dextranos–Sigma). Com base nestes dados, estimaram-se os tempos de incubação para a obtenção dos fragmentos de xiloglucano com cerca de 7, 50, 93, 170 e 330 blocos estruturais.

3. Atividades das β -galactosidases sobre os fragmentos de xiloglucano

Os fragmentos obtidos por precipitação etanólica e filtração em gel foram ensaiados com as β -galactosidases purificadas de *T. majus* e *C. langsdorffii* e analisados por três modos: enzimaticamente por galactose desidrogenase, por cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia de troca aniônica por HPAEC-PAD.

3.1. Análise por galactose desidrogenase

As galactoses livres geradas por hidrólise com a β -galactosidase foram quantificadas enzimaticamente e os resultados expressos em porcentagem de galactoses liberadas em relação ao total de galactoses disponíveis no oligossacarídeo.

Os valores médios de atividade β -galactosidase sobre os fragmentos de xiloglucano estão mostrados na **Figura 8**. Observa-se que os fragmentos se tornaram acessíveis à hidrólise somente quando estas moléculas apresentaram-se inferiores à 4 blocos, obtendo-se, um máximo de 7% de hidrólise das galactoses presentes. Nos fragmentos com mais de 7 blocos submetidos à hidrólise com C β -gal, verificou-se uma atividade hidrolítica muito baixa sobre estes substratos, chegando a ser nula em alguns casos. Já quando se compara com as amostras de oligossacarídeos de xiloglucano obtidos por hidrólise enzimática e sem precipitação etanólica (mistura de fragmentos contendo de 1 a 4 blocos altamente galactosilados), observa-se uma atividade hidrolítica muito superior, aproximadamente 40% (dados não mostrados).

Os valores expressos na **Figura 8** referem-se à atividade da β -galactosidase de *C. langsdorffii*, sendo que o padrão de resposta analisado para a enzima de *T. majus* foi semelhante (dados não mostrados).

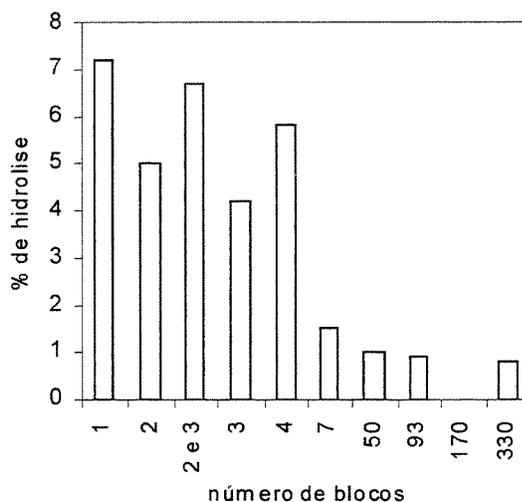


Figura 8. Atividade de β -galactosidase de *C. langsdorffii* sobre fragmentos de xiloglucano de vários tamanhos. Os ensaios enzimáticos foram realizados em pH 5,0, 30^oC/20h. Os dados estão expressos em porcentagem de hidrólise de galactose liberada em relação ao total de galactose disponível nos substratos.

Em um outro estudo envolvendo a atividade de β -galactosidases fúngica (*Aspergillus oryzae*), animal (de fígado bovino) e de bactéria (*Escherichia coli*) sobre o polímero de xiloglucano, verificou-se que nenhuma das enzimas foi capaz de hidrolisar as galactoses presentes no polissacarídeo. Da mesma forma, β -galactosidases obtidas de vários tecidos de plantas jovens de jatobá (*Hymenaea courbaril*) não foram capazes de hidrolisar o polímero (dados não mostrados).

3.2. Atividade de β -galactosidase em conjunto com XET sobre substrato natural

O material obtido através da precipitação etanólica em 6 volumes (fragmentos de xiloglucano com 2 blocos estruturais, predominantemente) foi incubado com as β -galactosidases purificadas de *C. langsdorffii* e *T. majus* na presença ou não de XET de *T.*

majus sendo que para cada amostra o substrato foi utilizado em duas concentrações: 0,3 mM e 3,0 mM. Segundo Fanutti et al. (1993), estas concentrações de substrato favorecem atividades hidrolítica ou transglicolítica da XET, respectivamente.

A **Figura 9** mostra um perfil de eluição de cromatografia de troca aniônica (HPAEC-PAD) das amostras de xiloglucano em duas concentrações ensaiadas com XET (30°C/20h). Os resultados mostraram que para a concentração mais baixa do substrato (0,3 mM) a XET foi capaz de hidrolisar os fragmentos de 2 blocos de xiloglucano (F2), resultando num aumento de F1 que corresponde aos blocos estruturais do xiloglucano. Quando se empregou alta concentração do substrato (3,0mM), o perfil das amostras de oligossacarídeos mostrou que a XET agiu produzindo blocos com pesos moleculares médios superiores a F2 (**Figura 9**), ou seja, transglicosilando.

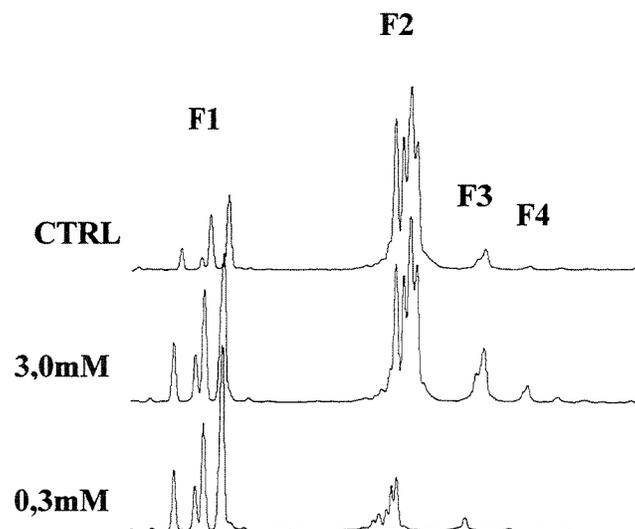


Figura 9. Análise por HPAEC-PAD das amostras de oligossacarídeos de xiloglucano tratados com XET de *T. majus*. F1 constitui os oligossacarídeos de 1 bloco típicos de xiloglucano (da esquerda para a direita, XXXG, XLXG, XXLG e XLLG); F2 representa combinações dos blocos constitutivos de F1, formados por dois blocos, F3 e F4 representam combinações dos blocos F1 com número total de 3 e 4 blocos respectivamente.

Analisando a ação das β -galactosidases de *C. langsdorffii* e *T. majus*, por cromatografia em camada delgada, sobre os substratos (F2) nas duas concentrações citadas, observou-se que ambas enzimas atacaram o substrato nas condições de baixa concentração (**Figura 10**, colunas 2 e 4). Já quando os ensaios enzimáticos foram realizados em condições de alta concentração de substrato, verificou-se uma baixa atividade. (**Figura 10**, colunas 3 e 5).

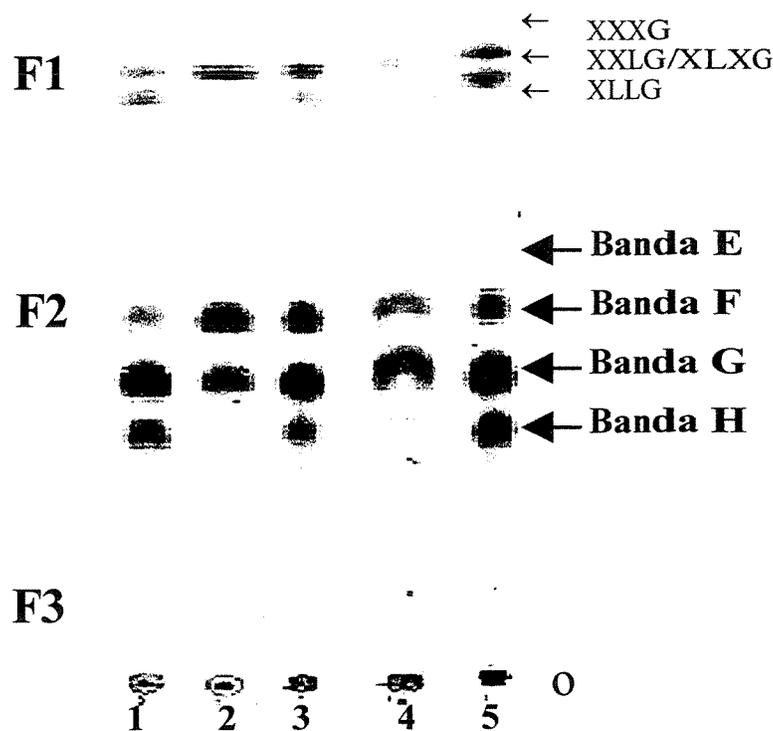


Figura 10. Análise por cromatografia de camada delgada dos fragmentos de xiloglucano de *C. langsdorffii* (F2) obtidos por hidrólise com celulase fúngica seguida de precipitação com 6 volumes de etanol tratados com β -galactosidase de *C. langsdorffii* e *T. majus*. Coluna 1, controle; colunas 2 e 3: amostras de 0,3 e 3,0 mM de substrato respectivamente tratadas com β -galactosidase de *C. langsdorffii*; colunas 4 e 5 tratadas com β -galactosidase de *T. majus*. O=origem

As análises das bandas correspondentes à fração F2 (bandas F, G e H) podem ser vistas na **Figura 11**. A banda “H” é constituída por 82% de XLLG o que significa que há uma grande probabilidade de que quase todo dímero (2 blocos) seja formado por XLLGXLLG, enquanto nas outras bandas (F e G), esta possibilidade é menor de acordo com a queda nas porcentagens do bloco XLLG.

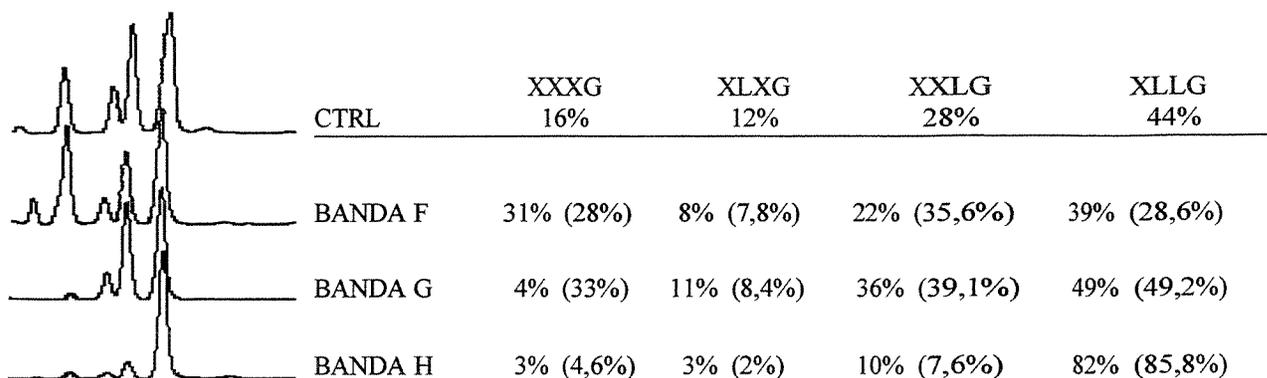


Figura 11. Análise por HPAEC-PAD das bandas F, G e H constituintes de F2 do xiloglucano de *C. langsdorffii* após hidrólise de cada banda isolada com celulase fúngica (Megazyme). À esquerda, são mostrados os cromatogramas dos oligossacarídeos. a) XXXG; b) XLXG, c) XXLG e d) XLLG, e à direita dados expressos em porcentagem da área dos picos provenientes dos cromatogramas. Os valores expressos em parênteses referem-se ao xiloglucano de *Tamarindus indica* conforme descrito por Fanuti et al. 1993. CTRL = controle.

Comparando-se as Figuras 10 e 11, verifica-se que em concentrações mais baixas de substrato (F2) ambas as β -galactosidases atacam prontamente a banda H que possui, conforme observado na Figura 10, altas proporções de domínios “XL” no terminal não redutor. O ataque enzimático aos oligossacarídeos, na concentração de 0,3 mM de substrato, gerou uma nova banda (E na Figura 10) que é consistente com a estrutura XXXGXXXG conforme Fanuti et al. 1993.

A **Tabela 2** mostra o efeito dos diferentes tratamentos enzimáticos (β -galactosidase de *C. langsdorffii* e XET) sobre o substrato F2 nas diferentes condições de ensaio. Os dados estão expressos em porcentagem da área dos picos (oriundos dos cromatogramas de HPAEC-PAD) relacionados a cada bloco constitutivo. Os valores de F2 presentes no controle mostraram que há certa contaminação com F1 e F3.

Analisando a atividade de β -galactosidase (sem XET no meio de reação) em diferentes concentrações de substrato, verificou-se que, apesar das mudanças dentro das bandas de F2 (**Figura 10**), as porcentagens totais entre os blocos não sofreram alterações significativas, quando comparadas ao controle. O modo de ação da XET foi dependente da concentração de F2, variando substancialmente em relação ao controle (**Fig. 9 e Tabela 2**)

Tabela 2. Variação nas proporções entre os blocos submetidos às diferentes condições de ensaio enzimático. Os valores foram obtidos através da soma das áreas dos picos atribuídos a cada fração (F1, F2 e F3) e estão expressos em porcentagem da área total dos picos oriundos dos cromatogramas de HPAEC-PAD. Os dados dos blocos F4 foram computados (quando presentes) mas não estão mostrados nesta tabela. (C β -gal)= β -galactosidase de *C.langsdorffii*. CTRL = controle.

Fragmentos de xiloglucano	Tratamentos Enzimáticos						
	Ctrl	Substrato 0,3mM			Substrato 3,0mM		
		C β gal	XET	C β gal + XET	C β gal	XET	C β gal + XET
F1	16	18	72	75	18	33	31
F2	79	78	24	21	79	55	58
F3	4	3	4	4	3	9	9

No entanto, a atividade da β -galactosidase não alterou o padrão de ataque da XET ao substrato F2, sugerindo que, durante a mobilização *in vivo*, a ação da β -galactosidase ocorre de forma independente ou não sinérgica, da XET. Experimentos idênticos realizados com a β -galactosidase isolada de *Tropaeolum majus* deram resultados semelhantes aos obtidos com a β -galactosidase de *C. langsdorffii* (resultados não mostrados).

DISCUSSÃO

1. Purificação da β -galactosidase de *Copaifera langsdorffii*

O procedimento adotado para a purificação da β -galactosidase foi elaborado a partir de adaptações para FPLC do protocolo original proposto por Edwards et al. (1988). O processo de purificação foi precedido pela digestão do xiloglucano endógeno (presente no extrato enzimático) através da incubação do extrato bruto à temperatura de 30°C. Esta etapa teve como objetivo obter um extrato bruto com a menor contaminação pelo polissacarídeo e uma alta atividade enzimática, que por fim evitou várias dificuldades causadas pela geleificação do xiloglucano durante o processo de purificação da enzima. Após precipitação com sulfato de amônio o extrato passou por cromatografias de troca aniônica e catiônica, não sendo necessária a etapa de cromatografia de filtração em gel conforme descrito por Edwards (1988). Em comparação com o protocolo original, a purificação da β -galactosidase de *T. majus* empregando cromatografia líquida de rápida performance (FPLC) resultou num excelente ganho de atividade específica nos extratos, além de propiciar resultados altamente repetitivos. Além disso, o processo completo de purificação foi realizado em um espaço de tempo significativamente menor em relação ao procedimento descrito na literatura e com obtenção da enzima purificada, pelo menos no que concerne a ausência das atividades de XET, β -glucosidase e α -xilosidase.

2. Obtenção dos fragmentos de xiloglucano

As técnicas utilizadas na separação de fragmentos de xiloglucano apresentaram grande eficiência na obtenção dos fragmentos tanto formados por até quatro blocos estruturais quanto aqueles de pesos moleculares mais altos. Nos materiais de baixo peso, o excelente grau de separação se deu após a precipitação etanólica dos fragmentos de xiloglucano hidrolisados por celulase fúngica. Os diferentes volumes de etanol adicionados à mistura de oligo e polissacarídeos após hidrólise enzimática favoreceram a precipitação fracionada de misturas de polímeros com o mesmo peso molecular que permitiram a separação de agrupamentos distintos de blocos constitutivos de xiloglucanos. Assim, fragmentos de xiloglucano com dois, três e quatro blocos foram isolados com facilidade, permitindo estudos mais aprofundados sobre a estrutura fina¹ do xiloglucano de copaíba (*C. langsdorffii*) (Figuras 10 e 11) e subsequentemente sua comparação com a estrutura fina do xiloglucano de *Tamarindus indica* que já foi exaustivamente estudada (Fanuti et al., 1993 e 1996). Os resultados mostraram que o xiloglucano de copaíba apresenta essencialmente a mesma estrutura fina que o xiloglucano de *T. indica*, uma vez que os blocos duplos encontrados apresentam-se em proporções e composições similares. Este foi um ponto importante no trabalho, uma vez que permitiu extrapolar, com maior grau de confiabilidade, os resultados obtidos com a ação das enzimas sobre o polímero de uma espécie para o da outra.

Em 1992, Buckeridge et al. compararam a estrutura fina dos xiloglucanos de *C. langsdorffii*, *T. indica* e *T. majus*. Esses autores observaram que pequenas alterações no

¹ O termo estrutura fina se refere ao arranjo das moléculas de monossacarídeos em uma macromolécula de um polissacarídeo considerando a distribuição (aleatória, agregada ou uniforme) das ramificações e/ou de tipos de ligações glicosídicas na cadeia principal do polímero. No caso dos xiloglucanos as proporções entre os blocos constitutivos e sua seqüência na molécula polimérica podem ser considerados como estrutura fina.

conteúdo de galactose significam alterações importantes na distribuição das galactoses no polímero. Foi observado que *C. langsdorffii* pode apresentar (dependendo da origem da população) xiloglucano composto por proporções até 2 vezes maiores de XLLG. Com os dados obtidos no presente trabalho (**Figura 11**) é possível, agora, comparar as estruturas finas dos polímeros de *T. majus* (Fanuti et al. 1993) e *C. langsdorffii* em um nível ainda mais profundo. Da comparação pode-se concluir que a diferença está principalmente na proporção de XLLG nos fragmentos da banda F.

3. Atividade da β -galactosidase sobre fragmentos de xiloglucano

As misturas de oligossacarídeos obtidas por hidrólise com celulase de *Trichoderma* sp e precipitação fracionada com etanol (6 volumes), foram analisadas por cromatografia de troca iônica de alta performance (HPLC-Dionex). O perfil foi comparado com aqueles obtidos após hidrólise com a β -galactosidase de *Tropaeolum majus* e *Copaifera langsdorffii*.

A ação da β -galactosidase de *T. majus* foi muito similar ao demonstrado por Alcântara et al. (1999), isto é, o ataque foi específico sobre as posições XL. Em outras palavras, somente os oligossacarídeos XLXG e XLLG foram atacados, produzindo uma mistura onde predominaram os oligossacarídeos XXXG e XXLG.

Segundo Fanuti et al. (1993), em *Tamarindus indica* F2 é uma mistura complexa de oligossacarídeos que constituem cadeias principais com oito glucoses (p. ex. XXXGXXXG e os demais com diferentes graus de galactosilação). Apesar de ainda não haver conhecimento sobre a composição de oligossacarídeos em *C. langsdorffii* pode-se observar que em relação à composição encontrada para *T. indica*, não deve haver grandes diferenças,

uma vez que o perfil em HPAEC-PAD é muito similar. Ainda levando-se em conta o trabalho de Fanutti et al (1993), a faixa correspondente a F2 foi isolada e sua composição analisada por HPAEC-PAD. Neste trabalho as diferentes bandas foram identificadas de acordo com a descrição usada por esses autores, sendo a banda E, **XXLGXXXG**, **XXXGXXLG** e **XXXGXLXG**; a banda F, **XXLGXXLG**, **XXXGXLLG**, **XLLGXXXG** e **XXLGXLXG**; a banda G, **XXLGXLLG**, **XLLGXXLG**; e a banda H, **XLLGXLLG**.

As β -galactosidases estudadas apresentam uma maior afinidade sobre substrato de menor peso molecular. O perfil do ataque das β -galactosidases de *C. langsdorffii* e *T. majus* demonstrou que ambas são capazes de atacar apenas parcialmente os oligossacarídeos F2. Isto sugere que o ataque enzimático é parcial assim como acontece com os oligossacarídeos de F1 (**Figura 8**). Isso aconteceu mesmo quando foram utilizadas duas concentrações diferentes de substrato. A análise da mistura contendo baixo teor de substrato (0,3 mM) incubado com β -galactosidase demonstrou que ambas enzimas são capazes de atacar parcialmente os fragmentos de F2, ou seja, a β -galactosidase só é capaz de atacar as galactoses nas posições **XL** que estejam no terminal não redutor da molécula dos fragmentos de baixo peso molecular. Essas observações foram confirmadas pelos resultados da análise por CCD mostrada na **Figura 9**, em que houve o total desaparecimento da banda H (formada exclusivamente por blocos **XLLGXLLG**) após tratamento com a β -galactosidase de *C. langsdorffii* e quase total após tratamento com a β -galactosidase de *T. majus*. A explicação para o desaparecimento da banda H, após o ataque da β -galactosidase, é que o oligossacarídeo **XLLGXLLG** foi transformado em um dos blocos dímeros característicos da Banda G (**XXLGXLLG**).

O tratamento de fragmentos de xiloglucano de diversos tamanhos com as β -galactosidases puras de *C. langsdorffii* e *T. majus* revelou que a liberação de galactoses livres só pode ser observada a partir de fragmentos contendo no máximo 4 blocos constitutivos. Estes dados confirmam a observação de Alcântara et al. (1999) de que a β -galactosidase só é capaz de atacar as galactoses em algumas posições específicas (XL) no terminal não redutor de fragmentos pequenos de xiloglucanos e que, conseqüentemente, tais sítios não são acessíveis ao ataque de β -galactosidases quando ocorrem internamente na molécula.

Estas observações levam à sugestão da existência de um mecanismo altamente sofisticado na degradação de xiloglucano. Como esses motivos (XL) não são abundantes e, como já visto na análise da estrutura fina do xiloglucano de *C. langsdorffii*, os motivos XL apresentam uma distribuição mais tendente a uniforme do que agregada, pode-se considerar que o acesso das β -galactosidases ao xiloglucano é bastante restrito e dependente da ação de uma endo enzima que exponha os sítios XL no terminal não redutor. Com isto, esse sítio pode inclusive ser considerado como um ponto de controle na degradação de xiloglucanos. Por outro lado, mesmo que existam no interior da molécula do polissacarídeo, as galactoses desses motivos XL, elas seriam inacessíveis à enzima.

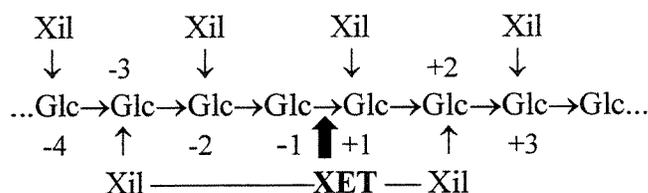
Quando a mistura contendo alta concentração de substrato (3,0 mM) foi incubada com β -galactosidase, ficou visível que ambas enzimas são inibidas por seu produto final (Alcântara et al. 1999), demonstrando que, com o aumento da concentração do substrato ocorre aumento no teor de galactose livre, levando a enzima a praticamente paralisar a sua ação. Conforme Alcântara (2000) esta característica provavelmente tem um importante

papel no processo de mobilização de xiloglucanos, impedindo a saturação do sistema de transporte de monossacarídeos direcionado ao interior da célula.

4. Avaliação da atividade da XET na presença de β -galactosidase

As duas formas de ação da XET de *T. majus* (transglicosilase e hidrolase), dependentes das proporções entre a enzima e o substrato, são importantes quando se pensa na interação entre as enzimas relacionadas ao metabolismo do xiloglucano. As hipóteses testadas foram que a atividade da β -galactosidase poderia ser regulada em função da ação dominante da XET, ou ainda, que a β -galactosidase poderia modular a ação da XET em função da concentração de substrato (xiloglucano).

O modo de ação da XET de *T. majus* como descrito por Fanutti et al. (1996) demonstra que essa enzima necessita reconhecer um trecho mínimo essencial para clivar o xiloglucano. Esses sítios limitadores ou moduladores da ação da XET estão esquematizados abaixo, onde a numeração é referente à distância dos resíduos na cadeia em relação ao ponto de hidrólise:



Conforme descrito por Fanuti et al. (1996), as substituições de xilose nos resíduos de glucose -4, -2, +1 e +3 não são necessárias para a ação da XET de *T. majus*, porém as substituições de xilose +2 e talvez a -3 sejam essenciais. No mesmo trabalho, Fanutti e colaboradores ainda demonstraram que as substituições de resíduos de galactose nas

posições +2 e possivelmente -3 não inibem a ação da enzima. Esses resultados sugerem que o sistema de degradação possa ser paralisado em F2, promovendo assim a ação das exohidrolases durante a mobilização do polissacarídeo.

Com a posse das informações e dos resultados descritos no presente trabalho sobre a ação conjunta da β -galactosidase e da XET, pode-se propor que durante a mobilização das reservas de xiloglucano dos cotilédones, a atividade de uma enzima é totalmente independente da ação da outra. Dados recentes de nosso laboratório com o sistema de mobilização de xiloglucano de jatobá (*Hymenaea courbaril*), indicam que a β -galactosidase é ativa principalmente no período noturno (entre 22 e 02 horas) enquanto a atividade de XET é máxima no período diurno, sendo o pico de atividade entre 10 e 14 horas. (H.P.Santos, L.V.Amaral e M.S. Buckeridge, resultados não publicados), sendo portanto provável que em outros sistemas as atividades das duas enzimas sejam temporalmente separadas. Assim, pode-se especular que, uma vez iniciado o processo de mobilização do polissacarídeo pela XET, os fragmentos de xiloglucano se tornariam disponíveis à ação da β -galactosidase em um momento e numa situação distinta, uma vez que a capacidade hidrolítica da β -galactosidase é máxima em pH 3,2, condição diferente das outras hidrolases do sistema de degradação de xiloglucano que são ativas em pH 5,0. Com a confirmação e extensão do nível de especificidade das β -galactosidases em relação ao peso molecular do substrato o modelo proposto por Tiné et al. (2000) na **Figura 4** é reforçado ainda mais, já que a atividade da XET deve ocorrer preliminarmente para produzir os oligossacarídeos, e apenas a partir destes fragmentos a ação das β -galactosidases pode ser verificada.

CONCLUSÕES

As β -galactosidases de *C. langsdorffii* e *T. majus* atacam apenas fragmentos contendo no máximo 4 blocos estruturais de xiloglucano.

As β -galactosidases de *C. langsdorffii* e *T. majus* atacam as galactoses em algumas posições específicas no terminal não redutor de fragmentos pequenos de xiloglucanos (XL).

A β -galactosidase não pode modular a ação da XET.

O xiloglucano de *C. langsdorffii* apresenta estrutura fina similar à do xiloglucano de *Tamarindus indica*, apresentando no entanto maior agrupamento das galactoses no xiloglucano de *C. langsdorffii*.

BIBLIOGRAFIA

- ALCÂNTARA, P.H.N., DIETRICH, S.M.C., BUCKERIDGE, M.S. 1999. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLGX) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. **Plant Physiol. Biochem.** 37(9): 653-663.
- ALCÂNTARA, P.H.N., 2000. Isolamento e caracterização das enzimas xiloglucano endo transglicosilase e β -galactosidase do catabolismo do xiloglucano de reserva dos cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). Universidade Federal de São Paulo, Tese de Doutorado, 98p.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M., 1994. Seeds: Physiology of development and germination. 2ed 445p.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein-Dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254.
- BUCKERIDGE, M.S., DIETRICH, S.M.C., 1990. Galactomannans from brasilian seeds. **Rev. Brasil. Bot.** 13 109-112
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P., TINÉ, M.A.S. 2000a. Mobilisation of storage polisaccharides in seeds. **Plant Phys. Biochem.** 38(1/2):141-156.
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P., TINÉ, M.A.S., LIMA, D.U. 2000b. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos biológicos. **Revista brasileira de fisiologia vegetal** 12 ed.especial 177-162
- BUCKERIDGE, M.S., REID, J.S.G. 1996. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. **Ciência e Cultura** 48(3): 153-162.
- BUCKERIDGE, M. S., DIETRICH S. M. C. 1996, Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-faboideae). **Plant Science** 117, p.33-43.
- CARPITA, N.C., GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. **The Plant J.** 3(1): 1-30.
- BUCKERIDGE, M.S., ROCHA, D.C., REID, J.S., DIETRICH, S.M.C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. **Physiol. Plant.** 86: 145-151.
- COSGROVE, D.J. 1999. Enzymes and others agents that enhance cell wall extensibility. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 50:391-417.

- CROMBIE, J. HAZEL, CHENGAPPA, S. HELLYER, A., REID, J.S.G. 1998. A xyloglucan oligosaccharide-active, transglycosylating β -D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seedlings - purification, properties and characterization of a cDNA clone. **Plant J.** 15, n.1, 27-38.
- DUBOIS, M., K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, F. SMITH, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal.Chem.** 28, 350-356.
- EDWARDS, M., BOWMAN, Y.J.L., DEA, I.C.M., REID, J.S.G. 1988. A β -D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) cotyledons. **J. Biol.Chem.** 263(9): 4333-4337.
- EDWARDS, M., I. C. M. DEA, P. V. BULPIN, J. S. G. REID. 1986. Purification and properties of a novel xyloglucan-specific endo-(1,4)-beta-D-glucanase from germinating nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.). **J. Biol. Chem.** 261, 9489-9494.
- EDWARDS, M., I. C. M. DEA, P. V. BULPIN, J. S. G. REID. 1985. Xyloglucan (amyloid) mobilization in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds Following germination. **Planta** 163, 133-140.
- FANUTTI, C., M. J. GIDLEY, J. S. G. REID, 1991. A xyloglucan oligosaccharide specific alpha-D-xylosidase or exo-oligoxyloglucan-alpha-xylohydrolase from germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. Purification, properties and its interaction with a xyloglucan-specific endo-(1,4)-beta-D-glucanase and other hydrolases during storage xyloglucan mobilization. **Planta** 184, 137-147.
- FANUTTI, C., M. J. GIDLEY, J. S. G. REID, 1991. Substrate subsite recognition of the xyloglucan endo-transglycosylase or xyloglucan-specific endo-(1,4)- β -D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. **Planta** 200, 221-228
- FANUTTI, C., M. J. GIDLEY, J. S. G. REID, 1993. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-(1,4)- β -D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. **Plant J.** 3, 691-700.
- FRY, S.C. YORK, W.S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A, HAYASHI, T., JOSELEAU, J.P., KATO, Y., LORENCES, E.P., MACLACHLAN, G.A, MCNELL, M., MORT, A.J., REID, J.S.G., SEITZ, H.U., SELVENDRAN, R.R., VORAGEN, A.G.J., WHITE, A.R., 1993. Unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiol. Plant.** 89, 1-3
- HAYASHI, T., OGAWA, K., MITISUISHI, Y. 1994, Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. **Plant Cell Physiol.** 35(8): 1199-1205.

- KOOIMAN, P., 1961. The constitution of tamarindus amyloid. **Rev. Trav. Chim.** 80 849-865
- KURZ, G., WALLENFELS, K., 1974. D-galactose. U.V.-assay with galactose dehydrogenase. **In: methods of enzymatic analysis**. P.1279-1282 ed. Verlag Chemie, Weinheim
- MAUSETH, J.D., 1991. Botany: an introduction to plant biology. **Saunds College Publishing**, Chicago
- MCCANN, M.C., ROBERTS, K. 1991. Architecture of the primary cell wall. In *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. C.W. Lloyd ed., Academic Press, London. p.109-129
- NISHITANI, K., TOMINAGA, R., 1991. *In vitro* molecular weight increase in xyloglucans by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis*. **Physiol.Plant.** 82, 490-497
- SAMPEDRO, J. SIEIRO, C., REVILLA, G., GONZÁLEZ-VILLA, T., ZARA, I., 2001 Cloning and expression pattern of a gene encoding na α -xylosidase active against xyloglucan oligosaccharides from arabidopsis. **Plant Physiol.** 126 910-920
- TINÉ, M.A.S., CORTELAZZO, A.L., BUCKERIDGE, M.S, 2000. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Plant Science.** 154 117-126
- TINÉ, M.A.S. 1997. Mobilização de xiloglucano de reserva em sementes de *Hymenaea courbaril* L. UNICAMP, Campinas. Dissertação de Mestrado. 85p.
- YORK, W. S., VAN HALBEEK, H., DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P., 1990, Strutural analysis of xyloglucan oligosaccharides by 1-H-n.m.r. spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydr. Res.** 200, 9-31
- WHITNEY, S. E. C., J. E. BRIGHAM, A. H. DARKE, J. S. G. REID, M. J. GIDLEY. 1995. In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. **Plant J.** v.8, p. 491-504.