

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Miguel José Minhoto

**O EFEITO DA TEMPERATURA NA AÇÃO DA
XILOGLUCANO ENDO-BETA-TRANSGLICOSILASE SOBRE
XILOGLUCANOS DE RESERVA.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) MIGUEL JOSÉ MINHOTO	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: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 32
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M663e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 50082
PROC 16-837102
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 30/07/02
Nº CPD _____

2

CM00171054-9

318 ID 249918

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

M663 *e*

Minhoto, Miguel José

O efeito da temperatura na ação da xiloglucano endo-beta-transglicosilase sobre xiloglucanos de reserva/Miguel

José Minhoto. --

Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

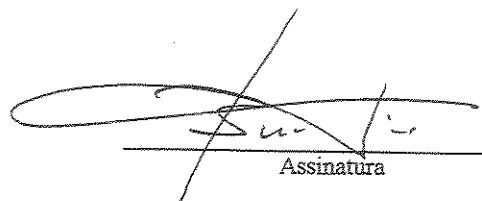
Instituto de Biologia

1. Xiloglucano. 2. Polissacarídeos de reserva. 3. Temperatura.
4. Carboidratos. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

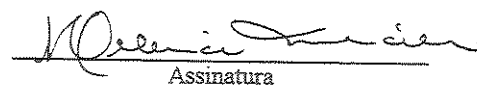
Data da Defesa: 03/05/2002

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)


Assinatura

Profa.Dra. Helenice Mercier


Assinatura

Prof.Dr. Watson Loh


Assinatura

Prof.Dr. Angelo Luiz Cortelazzo


Assinatura

1061750006

*"Nada tem sentido em
Biologia se não está sob
a luz da Evolução"*
Theodosius Dobzhansky

AGRADECIMENTOS

Ao Marcos Buckeridge pela orientação, confiança e amizade e que permitiu que este trabalho pudesse ser realizado (e por me resgatar do âmbar).

Ao Tiné pela amizade, idéias, sugestões, “co-orientação” e por gerenciar as poucas crises.

Ao Aidar pela amizade e por estar sempre pronto para uma boa discussão.

Ao Clóvis (C1) pelas incontáveis ajudas técnicas e pela amizade.

A Márcia Braga pela amizade e confiança.

Ao Henrique e ao Denis, por me ajudarem sempre que precisei.

A Liliana pelo auxílio na purificação da XET e nos tampões.

Ao “grupo de parede”, Ana Maria, Ana Baroni, Claudinha, Kelly, Clóvis (C2), Gustavo, Lourdes, Marília e Rodrigo pela acolhida e colaboração.

Aos Pesquisadores da Seção de Fisiologia e Bioquímica, pelas ótimas idéias e pela aceitação dentro do Instituto.

Aos demais amigos, colegas e funcionários da Seção de Fisiologia que fizeram este trabalho ser agradável.

A Dra. Shirlei, ao Dr. Edson, a Dra. Heide e a Dra. Laurecir pela amizade e confiança.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular e Estrutural por me aceitarem depois de tanto tempo.

A Lílíam e ao Sidnei pelo auxílio fundamental na parte burocrática.

Ao Dr. Franco Lajolo pelo uso (e abuso) do espectrofotômetro HP.

Ao Dr. Watson Loh e a Nara pelo uso do HSDSC.

Ao Dr. João Ruggiero e ao Dr. Marcelo Andrés Fossey pelos experimentos e interpretação dos dados do CD.

Aos os meus amigos e a Direção do Colégio Rio Branco – Higienópolis pelo incentivo e mesmo não entendendo absolutamente nada sobre a língua do “x”, sempre acharam interessante o que eu estava fazendo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
Parede Celular	11
Xiloglucano	13
Xiloglucano e Enzimas	17
• XET	17
• β -GAL	18
• α -Xilosidases e β -Glucosidases	19
Modelos de Degradação de Xiloglucanos em Sementes	20
Iodo	26
Iodo e Polissacarídeos	26
Xiloglucano e Iodo	28
OBJETIVOS	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
Extração de Xiloglucanos de Reserva	31
Soluções de Trabalho	32
Xiloglucano de feijão	32
Obtenção de Cotilédones para extração da XET	32
Protocolo de purificação da XET de <i>Hymenaea courbaril</i>	33
Preparação do Extrato Bruto	33
Fracionamento por Sulfato de Amônio	34
Cromatografia Hidrofóbica	35
Experimentos de Interação Iodo-Xiloglucano	35
Xiloglucano e pH	36
Xiloglucano e Temperatura	36
Ensaio da Atividade de XET – Ensaio Colorimétrico	37
Experimentos com HSDSC	38
Experimentos com Dicroísmo Circular	39
RESULTADOS	40
Ensaio com iodo/iodeto de potássio	40
Xiloglucano e pH	40
Xiloglucano e Temperatura	43
Xiloglucano e HSDSC	45
Xiloglucano e CD	46
Xiloglucano e Enzimas	48
Atividade XET por ensaio colorimétrico e temperatura	50
DISCUSSÃO	54
Ensaio com iodo/iodeto de potássio	54
Xiloglucano e Temperatura	54
Xiloglucano e HSDSC	56
Dicroísmo Circular	56
Xiloglucano e Enzimas	57
CONCLUSÕES	62
BIBLIOGRAFIA	63

ABREVIATURAS

β -gal - β -galactosidase

CD – dicroísmo circular

Fuc – fucose

Gal – galactose

Glc – glucose

HSDSC – High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry

XDA – atividade total de degradação do Xg

XET – xiloglucano endo- β -transglicosilase

XETA – atividade da XET

Xg – xiloglucano

Xil – xilose

RESUMO

Xiloglucano (Xg) é um polissacarídeo estrutural da parede celular e apresenta uma estrutura principal de resíduos de glucose $\beta(1,4)$ ligados (similar a celulose) e com ramificações regulares de resíduos de xilose com ligação $\alpha(1,6)$. As xiloses podem apresentar ainda, em certas posições, resíduos de galactose ligados $\beta(1,2)$. As certas galactoses podemos encontrar, eventualmente, resíduos de fucose ou arabinose ligados. Esse padrão de ramificações com xiloses presentes no polissacarídeo é que determina sua solubilidade, enquanto que os resíduos de galactose e de fucose provavelmente devem estar relacionados à capacidade que o xiloglucano apresenta em orientar as microfibrilas de celulose durante o crescimento e expansão celular. Da mesma forma que o amido, na presença de iodo, as soluções de Xg ficam azuladas e essa propriedade seria devida ao fato do Xg apresentar uma conformação helicoidal semelhante à do amido, com interior hidrofóbico. Utilizando Xg de sementes e de suspensão celular, foi possível estudar o efeito do pH e da temperatura na estabilidade do complexo Xg-iodo. Em todos os casos, o pH teve um efeito secundário se comparado com o efeito da variação da temperatura, entre 30 e 45°C, que permite o complexo se desfazer ao aquecer e refazer-se ao esfriar. Durante os ciclos de diminuição da temperatura, a recaptura do iodo foi mais lenta que a liberação (histerese) sugerindo que em certos casos a reorganização das moléculas requer pouca energia. Em *Hymenaea courbaril* o complexo se desfaz a 35°C e volta a refazer-se em 33,8°C. A análise da degradação do Xg em cotilédones de *Hymenaea courbaril* revelou que, em ciclo de 24 horas, a temperatura da superfície do órgão variou de 20 até 40°C. Em estudos feitos com a xiloglucano endo- β -transglicosilase (XET), que é uma das enzimas de mobilização da reserva do Xg nos cotilédones de *H. courbaril*, encontramos atividade ótima da enzima na mesma temperatura onde o complexo se desfaz. Esses resultados sugerem que a degradação do Xg da parede celular dos cotilédones poderia ser controlada pela temperatura, mais elevada durante o dia, que permitiria a quebra em grandes blocos de Xg, enquanto à noite, em temperaturas mais baixas, o metabolismo seria mais ativo e os blocos formados

durante o dia seriam degradados. Sob essas condições, a mobilização do carbono vindo do Xg dos cotilédones para o crescimento da plântula não se sobreporia à fotossíntese, sendo possível que este controle seja feito pela temperatura, que daria uma eficiência maior no uso do carbono pela plântula em desenvolvimento.

ABSTRACT

Xyloglucan is a cell wall polysaccharide structurally based on a backbone of β -1,4 linked glucosyl residues (similar to cellulose), which is branched with xylose (at α -0-6 position) in a fairly regular form. Xyloses at certain positions are branched with galactosyl residues at β -0-2 positions and further with fucosyl or arabinosyl residues are attached to certain galactoses. This branching pattern renders solubility to the polysaccharide and the distributions of galactoses and fucose appear to be related to the capacity that xyloglucan has to orient cellulose microfibrils during cell growth. As starch, in the presence of iodine (I_2/KI) xyloglucan solutions become blue and this property is thought to be due to the fact that Xg has a helicoidal conformation similar to starch. Using xyloglucans from seeds and cell tissue culture, we studied the effect of pH and temperature on the stability of the Xg-iodine complexes. In all cases, pH had a minor effect whereas under changing temperature Xg released/recaptured iodine between 30 and 45°C. During ascending cycles recapture of iodine was slower than release (hysteresis) suggesting that in certain cases the reorganisation of the molecules requires slightly more energy. In a study of the system of xyloglucan degradation in cotyledons of *Hymenaea courbaril*, we found that the surface temperature of the organ varied from 20 to 41°C during one day period. Also, a preliminary study of temperature optima for the enzyme xyloglucan endo- β -transglycosylase (one of the principal enzymes responsible for xyloglucan mobilisation) from the same cotyledons resulted in loss of activity with transition very similar to the changes in xyloglucan conformation. Our results suggest that degradation of xyloglucan in the cell wall might be controlled by temperature so that metabolism is shut down during the day (higher temperatures) and active overnight (lower temperature). As under such conditions mobilisation of carbon of Xg from cotyledons to the growing plantlet would not overlap with photosynthesis, it is possible that this temperature control renders a higher efficiency in carbon use by the growing plantlet.

Introdução

A parede celular, historicamente, foi fundamental para o descobrimento e desenvolvimento da Biologia Celular. Foi por causa das paredes do súber da cortiça que Robert Hook, em 1665, deu o nome de célula a unidade de todos os seres vivos. Bem mais tarde, no século XIX, começaram os estudos sobre as células vegetais, onde Schleiden, junto com Schwann, elaboraram a Teoria Celular. Schleiden trabalhou também com as paredes celulares sendo pioneiro nesses estudos. Os primeiros trabalhos sobre paredes de reserva com xiloglucano e sua mobilização durante a germinação também foram publicados no século XIX por Heinricher (1888) e Reiss (1889) utilizando sementes de *Impatiens balsamina*, *Tropaeolum majus* e *Cyclamen europaeum*. A partir de 1960, Koimann revisou a distribuição Botânica de um dos principais polissacarídeos que compõe a hemicelulose (o xiloglucano) utilizando a capacidade que este polímero apresenta de se corar com iodo/iodeto de potássio como uma forma de detecção em sementes.

Voltando mais no passado, no início da vida na Terra, é possível imaginar a importância que a parede celular tinha para as primeiras células, protegendo seus protoplasmas, e como ela foi se modificando, evoluindo, até chegar a forma das paredes existentes hoje, das bactérias modernas até os vegetais superiores. As adaptações sofridas por elas para permitir a sobrevivência em ambientes hostis, de elevada acidez e temperatura, ou em ambientes altamente favoráveis ainda estão longe de serem totalmente esclarecidas. Para cada organismo há uma estratégia; para cada estratégia, um nível distinto de complexidade. Isso permite que a evolução seja lenta e contínua.

Parede Celular

A forma que uma célula vegetal apresenta é determinada pela parede celular. Além da forma, a taxa de crescimento, funções e as especializações também acabam sendo determinadas pela parede celular (Carpita & McCann, 2001). Excetuando-se as células reprodutivas, todas as demais células de uma planta apre-

sentam parede celular (Mauseth, 1998). Ela pode ser considerada a matriz extracelular vegetal.

A parede celular é composta por um terço de celulose, um polímero com mais de 500 resíduos com ligações glicosídicas do tipo β (1,4) D-glucose, que forma agregados cristalinos, as microfibrilas de celulose, extremamente resistentes e com espessura de 10 à 25 nm. Grupos de microfibrilas são organizados em lamelas ou camadas e orientadas por microtúbulos, formando cadeias paralelas e sobrepostas ligadas intermolecularmente por pontes de hidrogênio e que recobrem a membrana plasmática completamente (Carpita & McCann, 2001). Cada polímero de celulose cresce graças ao complexo enzimático, onde a principal enzima, que é a *celulose sintase*, adiciona mais resíduos de glucoses à parede já formada, sempre no lado interno da parede e próximo à membrana plasmática. Essas enzimas, do complexo enzimático, devem estar ancoradas do lado exterior da membrana plasmática e são as responsáveis pelas alterações que ocorrem na parede (Brown, *et al.* 1996).

As microfibrilas de celulose estão ligadas a outros tipos de polissacarídeos chamados, genericamente, de hemiceluloses, que formam um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados. As hemiceluloses são produzidas no complexo de Golgi e exportadas para a parede em vesículas de dictiossomos, sendo depositadas entre as microfibrilas de celulose e ligadas fortemente a elas, por pontes de hidrogênio, produzindo uma estrutura sólida que analogamente pode ser comparada ao concreto armado. Nas paredes de plantas superiores há uma terceira categoria de polissacarídeos chamados de pectinas. Pectinas são um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados que contêm várias moléculas de ácido galacturônico carregadas negativamente. Além de fazer parte da estrutura da parede, as pectinas também são responsáveis pela adesão das paredes celulares dos tecidos vegetais formando uma camada chamada de lamela-média (Carpita & McCann, 2001).

Em todas as plantas encontramos células com paredes finas que são as paredes primárias. Em outros tipos de células, de um mesmo vegetal, encontramos paredes mais espessas e resistentes: a parede secundária. Ela é depositada

entre a parede primária e a membrana plasmática e, na maioria das vezes, após essa deposição o protoplasma morre. A parede secundária é normalmente muito mais espessa que a primária devido à deposição de outras substâncias que dão resistência mecânica, química e a ataques de fungos e bactérias. A parede celular, tanto a primária quanto a secundária, é permanente, não podendo ser degradada ou despolimerizada, como acontece com microtúbulos e com microfilamentos. Há um terceiro tipo de parede, um tipo especial que aparece em certas sementes: é a parede de reserva. Esse tipo de parede é comum em cotilédones de sementes que não formam endosperma, presentes em muitas dicotiledôneas; grande parte da reserva nutritiva para o desenvolvimento do embrião vem do polissacarídeo armazenado nas paredes, que é uma hemicelulose.

Dentre as hemiceluloses mais comuns podemos citar o xiloglucano, o glucuronoarabinoxilano e os glucanos de cadeia mista $\beta(1,3),(1,4)$ D-glucanos. Os xiloglucanos são os polímeros mais abundantes em dicotiledôneas e que formam tanto a hemicelulose de parede primária quanto da parede de reserva.

Xiloglucano

O xiloglucano é um polímero composto por uma cadeia principal celulósica em que resíduos de glucose estão ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1,4)$. Segundo a nomenclatura adotada (Fry *et al.*, 1993), os resíduos de glucose não ramificados são denominados G. As ramificações mais freqüentes da cadeia principal de glucose são:

- 1) resíduos de xilose, ligados à glucose através de ligação glicosídica $\alpha(1,6)$, sendo o dissacarídeo [α -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6) β -D-Glcp] denominado X;
- 2) a xilose pode apresentar uma galactose ligada $\beta(1,2)$, formando um trissacarídeo [β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2) α -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glcp] denominado L;
- 3) a galactose pode, ainda, apresentar uma fucose ligada $\alpha(1,2)$, formando um tetrassacarídeo [α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glcp] denominado F.

O xiloglucano de parede primária e o de reserva (acumulados nas paredes das células do parênquima cotiledonar) são semelhantes na sua estrutura e composição, exceto pela ausência de resíduos de fucose nos xiloglucanos de reserva presentes nas sementes (Figura 1).

Os xiloglucanos de reserva de *H. courbaril* apresentam uma série de oligossacarídeos com cinco glucoses na cadeia principal (Buckeridge *et al.* 1997) que diferem dos demais xiloglucanos estudados neste trabalho que apresentam oligossacarídeos com quatro glucoses na cadeia principal. O primeiro membro da série nova purificado foi caracterizado como XXXXG (Figura 2).

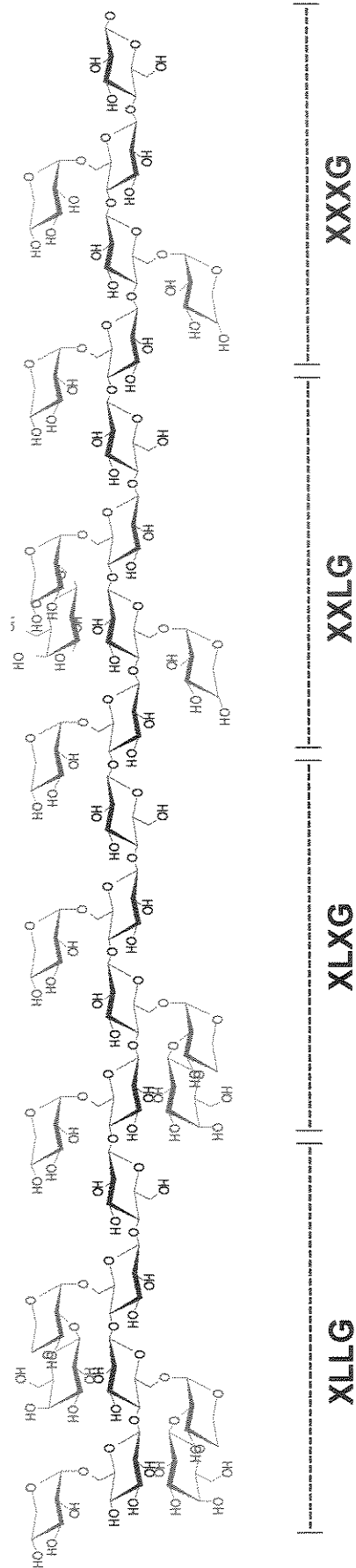


Figura 1. Estrutura do xiloglucano de reserva. Neste tipo de xiloglucano encontram-se os oligossacarídeos mais comuns. preto = glucose; azul = xilose; vermelho = galactose.

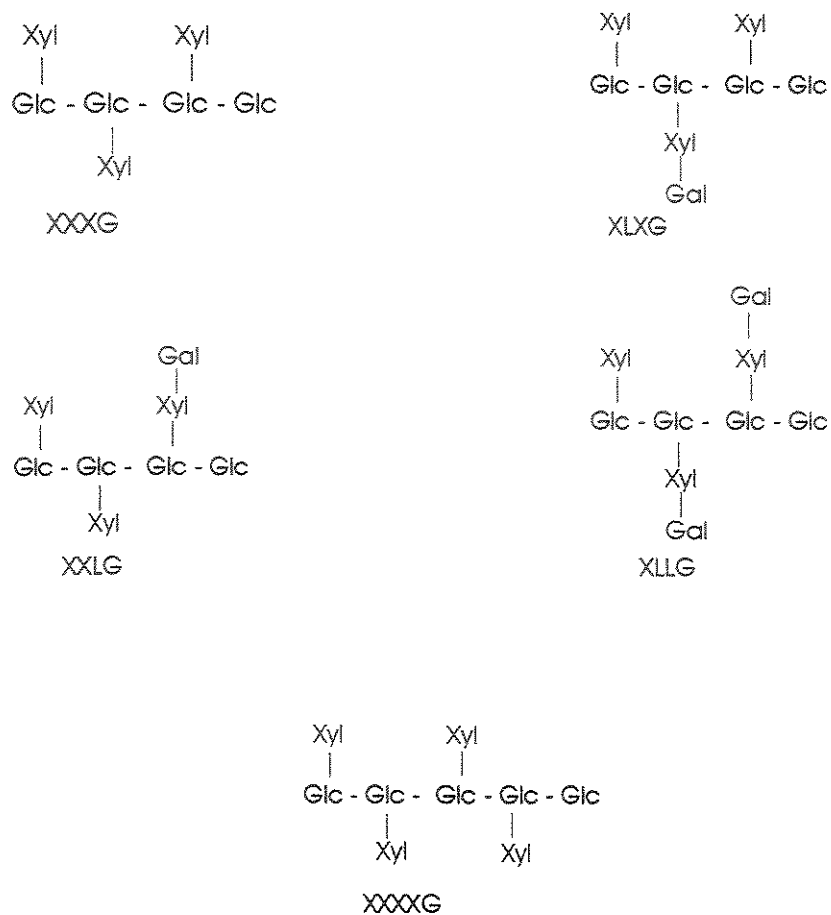


Figura 2 - Oligossacarídeos produzidos por hidrólise de xiloglucanos de sementes com celulase de *Trichoderma sp.* (X=glc-xil, L=glc-xil-gal e G=glc). A presença de XXXXG foi detectada apenas em sementes de *Hymenaea courbaril*.

Xiloglucano endo- β -transglicosilase (XET)

A xiloglucano endo- β -transglicosilase ou XET é uma enzima pertencente à classe das celulasas, cuja característica é ser composta por endo enzimas. Várias enzimas dessa classe têm a capacidade de hidrolisar tanto moléculas de celulose quanto de xiloglucano, produzindo fragmentos de massas molares menores. Por exemplo, em uma hidrólise exaustiva feita com celulase de *Trichoderma viride* há produção de uma mistura de oligossacarídeos que representam os blocos constitutivos da maioria dos xiloglucanos (Figura 2).

Edwards *et al.* (1986) conseguiram isolar uma *endo- β -(1,4)-glucanase* a partir de sementes de chagas (*Tropaeolum majus*) e demonstraram que essa enzima é extremamente específica para xiloglucanos. Trabalho realizado posteriormente por Fanutti *et al.* (1993) demonstrou que a estrutura da endo-glucanase é extremamente rara, pois não contém alfa hélice e possui 66% de dobras betas nas moléculas. Essas 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 sequência de aminoácidos (35 kDa). Ainda nesse trabalho de 1993, Fanutti *et al.* demonstraram que a enzima XET apresenta duas formas de ação distintas: uma ação de transglicosilase e outra, basicamente, de hidrolase. O tipo de atividade da enzima irá depender das proporções entre a mesma e o seu substrato. Quando a concentração de substrato (xiloglucano) é alta, a ação da enzima é de transglicosilação, ou seja, a enzima transfere blocos resultantes de hidrólise para outros blocos, construindo moléculas de maior peso molecular. Entretanto, se houver pequena disponibilidade de xiloglucano, 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 *et al.* 1991).

Contudo, 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 mobilização do xiloglucano. A atividade de endo-glucanase foi detectada em sementes de espécies brasileiras como *Copaifera langsdorffii* (Buckeridge *et al.* 1992; Alcântara, 2000), mas além da enzima de *Tropaeolum majus* (Edwards *et al.* 1986), nenhuma outra foi isolada e caracterizada até o momento.

Os recentes resultados obtidos por Tiné *et al.* (2000), e também por Alcântara *et al.* (2000), demonstraram que em cotilédones de *Hymenaea courbaril*, a XET detectada apresentou apenas a ação de transglicosilação e não a ação de hidrolase. Os últimos autores ainda demonstraram que a XET semi-purificada tem a capacidade 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.

Baseando-se nestes resultados, bem como nos resultados obtidos por Fanutti *et al.* (1993), é possível sugerir que o processo de transglicosilação seja fundamental na mobilização do xiloglucano.

β -galactosidase

Uma busca rápida nos bancos de dados mostrará que já foi isolado um grande número de β -galactosidases. Apesar disso, as 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, 1999). Uma diferença importante entre essas duas enzimas é que, segundo Edwards *et al.* (1988), a β -galactosidase de *T. majus* tem a capacidade de remover todas as galactoses presentes no polímero e também nos oligômeros. Contudo, não foi possível repetir esses resultados em nosso laboratório (Lima,

D.U. comunicação pessoal); e, além disso, a β -galactosidase de *T. majus* agiu muito mais rapidamente sobre os oligossacarídeos XLXG e XLLG, produzindo uma mistura de XLXG e XXXG, que lentamente foi transformada em XXXG (Silva, 2001). Segundo Alcântara *et al.* (1999), 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).

α -xilosidase e β -glucosidase

Uma α -xilosidase foi isolada e caracterizada como sendo específica para xiloglucanos por Fanutti *et al.* (1991). Essa enzima não age sobre o polímero, mas somente sobre os oligossacarídeos produzidos através de hidrólise por endoglucanase. A α -xilosidase retira uma xilose de cada vez dos oligossacarídeos XLLG, XLXG, XLXG ou XXXG e tem que agir em conjunto com uma β -glucosidase, como descrito por Crombie *et al.* (1998), onde xilose e glucose são retiradas alternadamente do final não redutor da molécula de cada oligossacarídeo. Seguindo assim, a ação conjunta das quatro enzimas citadas irá produzir os monossacarídeos utilizados no metabolismo celular dos tecidos em crescimento. Ainda no trabalho de Crombie *et al.* (1998), aprofundaram-se os estudos relativos às exo-enzimas do sistema de mobilização em *Tropaeolum majus*. Nesse trabalho foi isolada uma β -glucosidase específica para oligossacarídeos de xiloglucano e pode se constatado que esta enzima 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, que 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.

Modelos de degradação de xiloglucano em sementes

Buckeridge e Reid, em 1996, propuseram um modelo de degradação do xiloglucano em sementes de *T. majus* e (Figura 3), segundo esse 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. Posteriormente, estudos feitos em sementes de leguminosas tropicais (*Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea courbaril*) justificaram algumas alterações importantes naquele modelo.

Tiné *et al.* (2000), estudaram o sistema de mobilização de xiloglucano em cotilédones de jatobá (*Hymenaea courbaril*). Nesse estudo foi possível detectar as atividades de β -galactosidase, α -xilosidase, β -glucosidase e XET. Um estudo das condições ótimas para ação dessas enzimas sobre seus respectivos substratos revelou que a β -galactosidase, nesse sistema, possui pH ótimo não coincidente com as demais, isto é, apresentou um pH ótimo de 3,2, enquanto as demais enzimas, apresentaram pHs ótimos em 4,5. Isso permite sugerir que a β -galactosidase de *H. courbaril* possa ser o fator limitante no processo de degradação do xiloglucano.

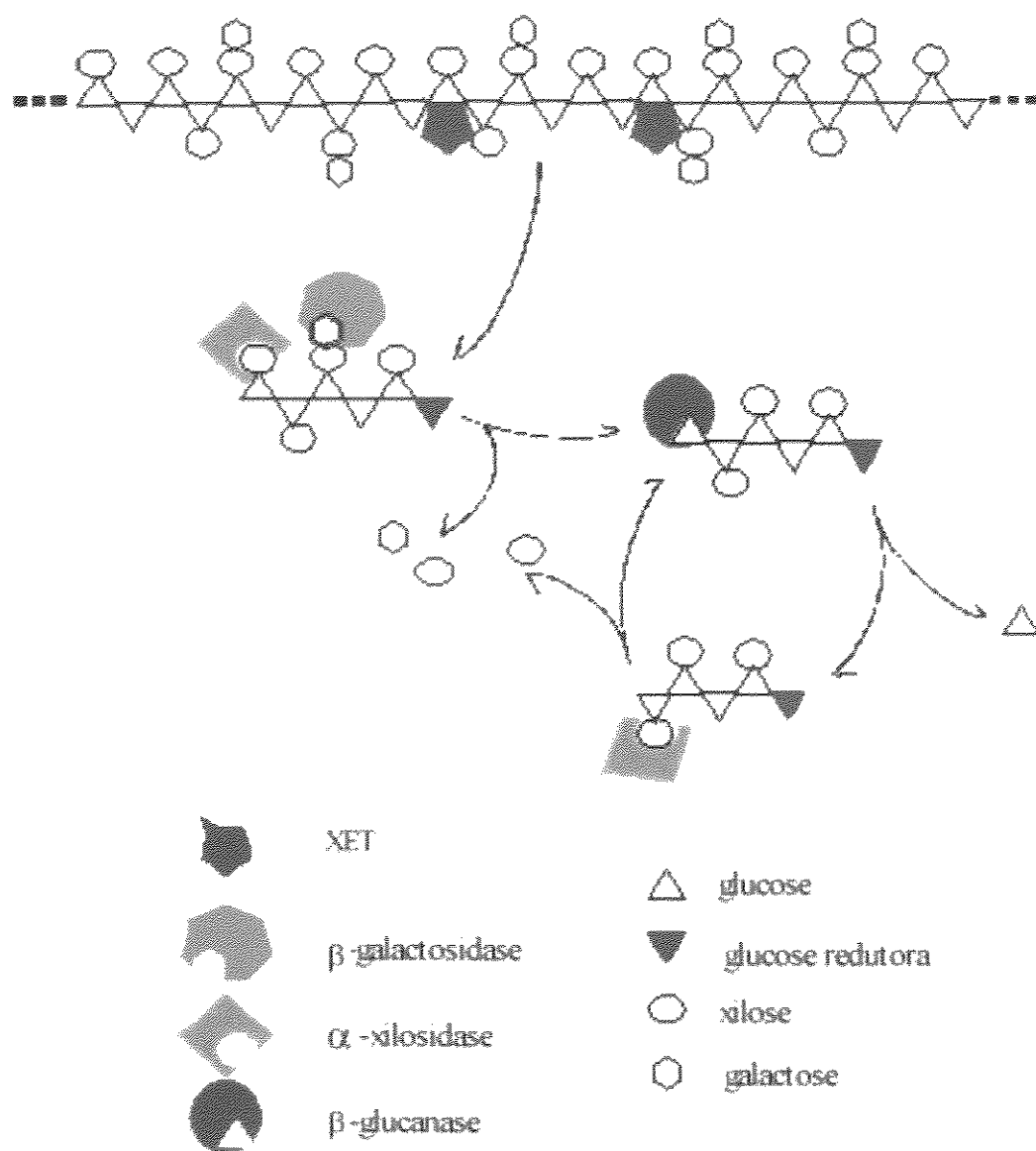


Figura 3: Modelo de degradação de xiloglucano proposto por Buckeridge e Reid, 1996 (modificado).

A atividade de XET foi verificada devido à redução na viscosidade, 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 (Tin   *et al.* 2000). Uma diferença importante em relação ao sistema de *Tropaeolum majus*    que em jatobá não há praticamente atividade de endo-  -glucanase, mas somente XET.

A atividade transglicol  tica da XET de *Hymenaea courbaril* pôde ser verificada através da incub   o do extrato enzimático em um meio de reação contendo oligossacarídeo e polissacarídeo, e utilizando cromatografia de filtração em gel para análise dos produtos (Alcântara 2000). Esses resultados sugerem que os oligossacarídeos de menor peso molecular sejam 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 quadro a seguir (Figura 4) exemplifica o modelo do processo acima descrito a partir dos resultados obtidos no trabalho de Alcântara (2000).

Paralelamente aos estudos com a XET, Alcântara *et al.* (1999) purificaram uma   -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   -galactosidase isolada não é capaz de atacar o polímero de xiloglucano, mas somente oligossacarídeos. Mais do que isso, ela são ataca as galactoses próximas ao terminal não redutor da molécula (XLLG e XLXG).

Apesar das informações estarem sendo obtidas de diferentes sistemas (*Tropaeolum majus*, *Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea courbaril*), está ficando cada vez mais claro que a   -galactosidase tem um papel de controle na desmontagem final dos olig  meros de xiloglucano em todos esses sistemas.

Com os dados dos trabalhos de Buckeridge & Reid, (1996), Alcântara, (2000), Tiné, (1997) e Tiné *et al.* (2000), foi possível montar um modelo da desmontagem dos polímeros de xiloglucanos de sementes (Figura 5). Nesse modelo há três fases, que são descritas abaixo:

- 1) Desmontagem parcial por ação da XET, provocando a diminuição considerável no peso molecular médio do xiloglucano; (Figura 4)
- 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.

As características das β -galactosidases de Leguminosae relacionadas à mobilização do xiloglucano sugerem que elas possam desempenhar, junto com a XET, um papel de controle na degradação do xiloglucano de reserva. Além da capacidade de reconhecer lados específicos 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 proceder sem a remoção da galactose (Crombie *et al.* 1998).

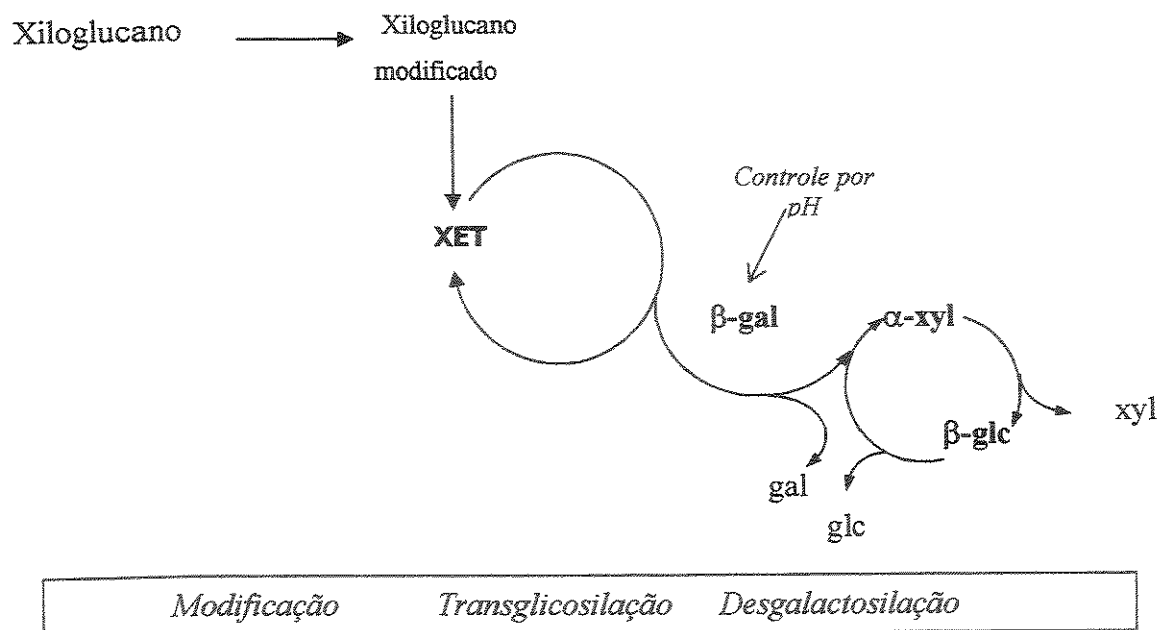


Figura 5. Modelo proposto por Tiné *et al.* 2000, para a desmontagem *“in vivo”* do xiloglucano de reserva em sementes. Inicia-se com o ataque da enzima XET ao polissacarídeo, que é parcialmente hidrolisado, e que pode passar a transglicosilar quando o peso molecular do polímero diminui muito. Apenas certos resíduos de galactose presentes nos oligossacarídeos XLXG e XLLG são hidrolisados (ou sofrem desgalactosilação) por ação da enzima β -galactosidase; os oligossacarídeos remanescentes dos fragmentos maiores, formados por XXLG e XXXG, entram no ciclo final de desmontagem, onde as glucoses e xiloses são atacadas pelas enzimas β -glucosidase e α -xilosidase, respectivamente, para produção de monossacarídeos livres.

Iodo

O iodo em solução demonstrou ser uma ferramenta importante e barata para o estudo de alguns polissacarídeos, como o amido e o xiloglucano, devido a forma como interage com esses açúcares. Há a necessidade de ressaltar algumas das suas propriedades, importantes para a metodologia usada neste trabalho.

Iodo é um elemento da família dos halogênios (elemento nº 53). É encontrado como sólido negro-azulado e facilmente sublimado produzindo um vapor púrpuro. Forma, como outros halogênios, moléculas diatômicas. Entretanto não é capaz de formar polímeros, cadeias simples ou ramificadas como carbono e silício (Jones & Atkins, 1999).

O iodo é solúvel em solventes orgânicos e origina uma gama variável de cores devido às interações entre o I_2 e as moléculas dos diferentes solventes. O iodo só é solúvel em água quando é capaz de ligar-se aos íons I^- presentes na solução e que proporcionam a formação de uma solução marrom formada pelo íon triiodeto I_3^- (Jones & Atkins, 1999).

O íon triiodeto é muito importante para alguns tipos de interações com carboidratos, principalmente para polímeros de glicose que formam estruturas helicoidais.

O iodo apresenta ponto de fusão de $114^\circ C$ e o seu ponto de ebulição de $184^\circ C$ (Jones & Atkins, 1999). Essas duas características são importantes para o trabalho apresentado já que as temperaturas em que os experimentos foram realizados são bem abaixo das temperaturas de fusão e ebulição do iodo.

Iodo e polissacarídeos

Os estudos dos complexos formados por iodo e polissacarídeos vêm sendo feitos há algumas décadas. Para a maioria dos polissacarídeos, o processo de formação da cor pelo complexo iodo-polissacarídeo não está bem estudado. Entretanto, quando falamos da relação iodo-amido, desde que estejam em solução aquosa, a estrutura dessa interação é relativamente melhor entendida.

A coloração azul formada pelo complexo iodo-amido é bem conhecida e a estrutura desse complexo foi descrita por *Rundle et al.* (1943) e que ainda hoje serve de base para qualquer tipo de estudo sobre esse complexo.

Estudos feitos com difração de raios-X por *Yu et al.* (1996) demonstraram que o amido apresenta estrutura em forma de hélice em sentido anti-horário, com diâmetro externo de 130 nm e espaçamento de 80 nm (Figura 6). Cada volta da hélice corresponde a seis resíduos de glucose (ou anidrogucose). Os íons de iodo são dispostos linearmente na cavidade interna da hélice, de 50 nm de diâmetro formando ligações de I—I com aproximadamente 31 nm de distância. Essas ligações formam cadeias de políiodo responsáveis pela coloração azul do complexo. Essas cadeias seriam formadas por 17 átomos de iodo no interior de uma hélice de 40 glucoses. Embora a descrição acima seja bem aceita para o amido, muitas questões são levantadas sobre o complexo iodo-xiloglucanos, principalmente em relação ao tamanho da cadeia de políiodo e as ramificações que essas cadeias poderiam apresentar e as diferentes formas de associação que poderiam ocorrer entre as diversas ramificações que os xiloglucanos podem apresentar.

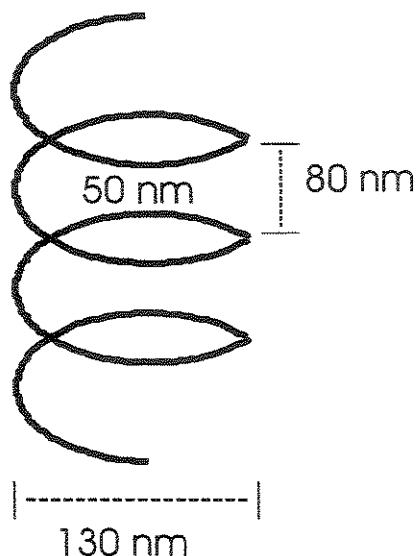


Figura 6. Hélice do amido e suas dimensões segundo *Yu et al.* 1996.

Xiloglucano e iodo

O xiloglucano em solução deve apresentar pelo menos duas conformações: em espiral e achatada (Levy *et al.* 1991 e 1997). A conformação em espiral ou helicoidal é fundamental para o complexo xiloglucano-iodo/iodeto de potássio.

Como acontece no amido, o xiloglucano reage com o íon triiodo, dando uma coloração azul (Figura 7) bem característica (Gailard *et al.*, 1969). O complexo poliiodo é formado no interior de uma suposta estrutura helicoidal do xiloglucano, porém não foi possível ainda precisar quantos átomos de iodo se acomodariam no interior da estrutura do xiloglucano e nem quantos resíduos de glucose seriam necessários para abrigar a cadeia de poliiodo (Yu *et al.*, 1996). Deve-se lembrar ainda que, diferente do amido, as ramificações presentes nas moléculas de xiloglucanos são de outros monossacarídeos, como xilose e galactose, diferente do amido que só apresenta glucoses.

O xiloglucano, que é uma hemicelulose, também tem função de reserva, como o amido, porém na parede de cotilédones de sementes que não formam endosperma, como *Hymenaea courbaril*, para nutrir o embrião e a plântula no início do desenvolvimento. Entretanto, comparando-o com o galactomanano, que é outro polissacarídeo de reserva, ramificado como o xiloglucano e o amido, não há reação com o íon triiodo. Isso poderia ser decorrente do fato que o galactomanano não forma uma estrutura helicoidal, ou se a forma, não com as dimensões adequadas, ou ainda que a presença de um esqueleto de manose, e não de glucose, não teria a capacidade de ligar ao triiodo.

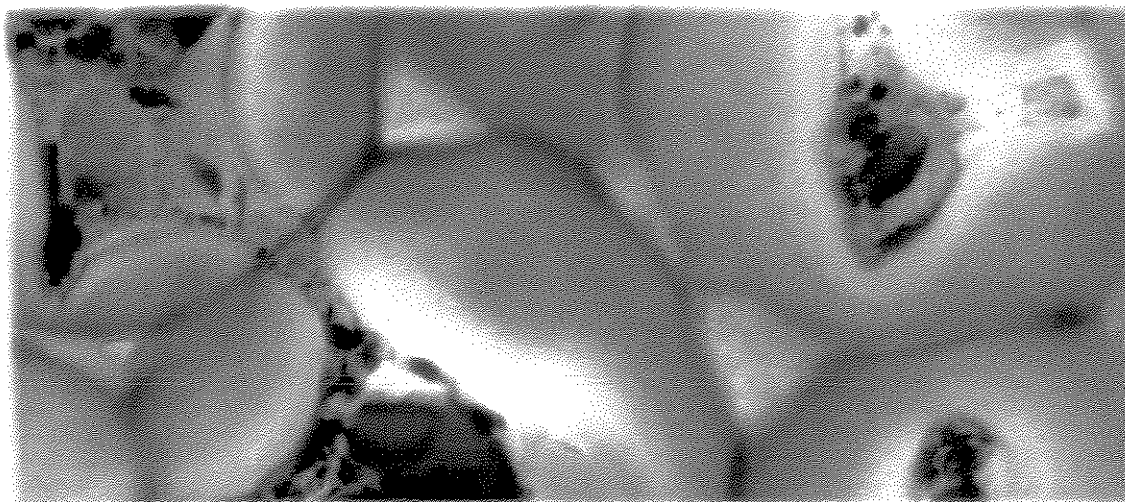


Figura 7. Fotomicrografia óptica de uma secção transversal de cotilédone de *Hymenaea courbaril*, corada com solução de I_2/KI .

Objetivos

A presente dissertação tem como objetivo principal utilizar a interação dos xiloglucanos de reserva com iodo, para compreender eventuais alterações físico-químicas (temperatura e transição de fase), bioquímicas e de susceptibilidade à ação da XET, dessas moléculas em diferentes temperaturas.

Material e Métodos

O material utilizado para extração de xiloglucanos de reserva foi retirado de sementes de *Hymenaea courbaril*, *Copaifera langsdorffii*, *Tamarindus indica* e *Tropaeolum majus*; o xiloglucano de parede primária foi obtido a partir de suspensão celular de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Extração de xiloglucanos de reserva

Para a extração de xiloglucanos de reserva foram utilizadas sementes dormentes de *Hymenaea courbaril*, *Copaifera langsdorffii*, *Tamarindus indica* e *Tropaeolum majus*. Depois de retiradas as cascas manualmente, as sementes foram fragmentadas em moinho de bola até atingir granulação de um pó bem fino. Após a obtenção do pó foi feita a extração em água destilada aquecida a 80° C (Kooiman, 1961) por um período de 8 a 9 horas. O material foi filtrado em malha de nylon e precipitado em etanol (3 volumes), sendo então armazenado por 15 horas a 5 °C e posteriormente foi lavado com acetona, seco e ressolubilizado em água destilada. Após a ressolubilização, o material foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos, repedindo a operação até não apresentar mais impurezas. O material foi passado em resinas de troca-iônica (Dowex) usando apenas água destilada como eluente, para retirar qualquer tipo de substâncias com carga elétrica, como ácidos urônicos. Em seguida, foi liofilizado e, terminado o processo, pesado e armazenado. O método original sofreu pequenas modificações para permitir um melhor rendimento na extração dos xiloglucanos e com o mínimo de impurezas. *Hymenaea courbaril* e *Copaifera langsdorffii* apresentaram um rendimento de 50% em relação à massa inicial de pó de semente, enquanto para *Tamarindus indica* o rendimento foi de 30% e para *Tropaeolum majus* cerca de 10%.

Soluções de trabalho

As soluções de trabalho, para uso com iodo/iodeto de potássio e ensaios enzimáticos, foram preparadas a 0,1% de xiloglucano. Para ensaios em HSDSC (High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry), foram usadas concentrações de 0,1; 0,5 e 1% e para 0,1 e 0,5% para CD (Circular Dichroism).

A todas as soluções adicionou-se azida sódica para evitar a crescimento de microorganismos. As soluções foram estocadas a 5° C.

Xiloglucano de feijão

O xiloglucano de feijão foi obtido a partir das suspensões celulares filtradas em tela de náilon tipo pele de ovo, para obtenção do meio extracelular (filtrado); ao filtrado foram adicionados 3 volumes de etanol para a precipitação dos polissacarídeos extracelulares. Esta solução foi centrifugada (18.000 g por 20 minutos), sendo o sobrenadante descartado e o resíduo ressuspendido em água destilada, dialisado contra água e liofilizado (Clóvis J. F. de Oliveira Jr. , Márcia R. Braga, Marcos S. Buckeridge – comunicação pessoal). O material liofilizado foi ressolubilizado em água destilada e passado em resina de troca iônica (Dowex). Como o xiloglucano presente nas paredes celulares de feijão é menos viscoso que o xiloglucano de reserva, não foi necessário usar água, ou qualquer outro solvente, como eluente.

Obtenção de cotilédones para extração da XET

Foram empregadas sementes de *H. courbaril* gentilmente cedidas pela Seção de Sementes do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. As sementes dormentes tinham uma massa média em torno de 5 g, confirmando o descrito por Tiné *et al.* (2000) e, seguindo procedimento dos mesmos autores, somente as sementes entre 3,0 e 6,5 g foram utilizadas nos ex-

perimentos para evitar as variações causadas por tamanhos de sementes muito diferentes.

As sementes foram escarificadas manualmente, por abrasão da casca com lixa de papel e desinfetadas por imersão em solução comercial a 10% de hipoclorito de sódio durante 5 minutos. Em seguida, foram enxaguadas com água corrente e imersas em água destilada por 12 horas, sendo, então, plantadas em vermiculita. As bandejas com sementes dispostas em espaços regulares foram mantidas a 25 °C em fotoperíodo de 12 horas. A coleta dos cotilédones para extração da XET baseou-se no fenótipo predominante (cotilédones enrugados, próximos do período de queda) em torno de 55 a 60 dias após a embebição das sementes, período do ápice da atividade de XET e que, contendo teores consideráveis de β -galactosidase, apresentam valores relativos menores de α -xilosidase e β -glucosidase. Neste período, os cotilédones já estão macios, com cerca de 30% da massa seca original e quase toda a reserva de xiloglucano mobilizada (Tin   *et al.* 2000).

Protocolo de purificação da XET de *Hymenaea courbaril*

A enzima foi purificada a partir de uma série de modifica  es na metodologia descrita por Edwards (1986). O procedimento básico mostrado por Alcântara (2000) foi mantido, porém não foi objetivo deste trabalho purificar a XET a homogeneidade, mas somente o suficiente para relacionar sua atividade com a temperatura fisiológica de transi  o do xiloglucano.

Prepara  o do Extrato Bruto

Os cotilédones foram colhidos, pesados e mantidos resfriados em gelo. Cada cotilédone foi seccionado em pequenas fatias com um estilete. Foram usados 10g de cotilédones fatiados. Os fragmentos, em pequenas porões, foram triturados em pulsos de 30s em homogeneizador modelo Ultra Turrax em presença de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 com NaCl 200 mM, na razão

de 1,5 a 2 mL para cada grama de cotilédone a ser processado. Antes de se homogeneizarem os cotilédones, adicionava-se polivinilpolipirrolidona (PVPP – insolúvel) na proporção de 2g para cada 100 mL de tampão usado. A mistura foi mantida sob agitação suave, durante 1h, para permitir uma maior solubilização das proteínas. Após esse tempo, a mistura foi filtrada em náilon tipo “pele de ovo”, espremendo-se manualmente os resíduos retidos na malha. O filtrado foi centrifugado a 27.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido, medindo-se o seu volume, que foi considerado o extrato bruto.

Fracionamento por sulfato de amônio

Após se verificar a estabilidade da atividade enzimática em presença desse sal, definiu-se o modo mais eficiente de seu emprego para a concentração e purificação parcial do extrato enzimático. Em primeiro lugar, adicionou-se sulfato de amônio ao extrato bruto até uma concentração de 30 %. O extrato foi mantido em repouso na câmara fria por 1 h, centrifugado a 27.000 g por 20 minutos. O volume do sobrenadante foi medido, adicionando-se a quantidade necessária de sal para elevar a concentração a 60% de sulfato de amônio. Após 1 h de repouso em câmara fria o extrato foi submetido a centrifugação (27.000 g, 20 min) e recolhendo-se o precipitado, este era ressuspensionado no menor volume possível de solução de NaCl 1 M ou em tampão fosfato de sódio pH 7,2 saturado a 30% de sulfato de amônio (1,24 M). O precipitado, retomado em NaCl 1M, foi dialisado em seguida contra o tampão fosfato de sódio. Ao se utilizar o tampão fosfato de sódio contendo sulfato de amônio, o extrato já podia ser aplicado diretamente na coluna de cromatografia hidrofóbica. A aparente remoção de substâncias que inibiam ou competiam com os substratos nos ensaios enzimáticos permitiu obter, nesta etapa, maior rendimento da atividade das enzimas do que o determinado no extrato bruto.

Cromatografia Hidrofóbica

O extrato enzimático retomado do precipitado obtido pelo fracionamento com sulfato de amônio foi submetido a cromatografia hidrofóbica por meio de coluna (com 23 mL de volume total) de resina hidrofóbica de Butil-agarose (Sigma) e ligada a um FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) Äkta Purifier (Amersham Biosciences). A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 com sulfato de amônio 1,24 M. A concentração inicial do processo de saturação, isto é, 30% do sal foi suficiente para reter na coluna a XET, sempre que o pH do extrato estivesse ajustado. Assim, na presente purificação, o pH foi ajustado em 7,2, do contrário nenhuma enzima teria sido capaz de interagir com o grupo butila. Após aplicação do extrato, a eluição total foi de duas vezes e meia o volume da coluna e com constante monitoramento com leitura em absorbância a 280 nm das frações coletadas, até a linha de base atingir a zero ou próximo disso e permanecendo constante. A atividade enzimática foi eluída por um gradiente decrescente de sulfato de amônio. A concentração de sal no tampão de eluição reduzia-se de 1,24 M até o tampão livre de sal. O controle do gradiente foi feito pelo software do equipamento, com a estratégia adequada ao método (Alcântara, 2000). De acordo com os picos obtidos no cromatograma (frações onde havia a indicação de proteínas), foram feitos ensaios colorimétricos para medir a atividade de XET (XETA) conforme Alcântara (2000). Após a determinação da atividade enzimática, as frações de interesse foram reunidas e novamente aplicadas, repetindo-se o gradiente, começando com a saturação feita pelo tampão sulfato de amônio até o tampão livre desse sal. Esse extrato foi reaplicado e eluído da mesma forma que na primeira aplicação, porém permitindo obter uma melhor purificação.

Experimentos de interação iodo-xiloglucano

A interação de iodo-xiloglucano é feita utilizando-se 100 µL de xiloglucano a 0,1% mais 0,9 µL tampão McIlvaine pH 4,0 e 50 µM, 1mL de I₂/KI a 10% e

podendo ou não acrescentar 1mL de Na_2SO_4 a 20%. O sulfato de sódio tem a capacidade de estabilizar em parte a interação iodo-xiloglucano. Após incubação por trinta minutos a 30°C foi feita a leitura da absorbância a 660 nm em espectrofotômetro Shimadzu. Após diversos experimentos, a retirada do sulfato de sódio mostrou-se ideal para os ensaios do efeito da temperatura, por permitir fazer diversas vezes com a mesma amostra elevação e diminuição das temperaturas sem que ocorresse a formação de “precipitados” de xiloglucanos.

Xiloglucano e pH

A determinação do pH ótimo do complexo xiloglucano- I_2/KI foi obtida através da elaboração de uma curva padrão, variando os pHs de 3 a 7 (com intervalos de 0,5 unidade) usando tampão McIlvaine (citrato-fosfato). Nos ensaios enzimáticos o tampão utilizado tinha o pH ótimo para a enzima.

Xiloglucano e temperatura

Para os ciclos de temperatura com o xiloglucano complexado com I_2/KI foi utilizado um espectrofotômetro HP 8453, com sistema “Peltier” para o controle de temperatura e cubeta de quartzo fechada para evitar a evaporação do iodo do complexo (uso gentilmente permitido pelo Prof.Dr. Franco Lajolo do Laboratório de Alimentos da USP). Os ciclos de temperatura iniciaram-se aos 20°C, elevando-se de 3 em 3°C e deixando por cinco minutos para estabilizar, até chegar aos 47°C. Quando atingida a temperatura máxima programada, iniciava-se o retorno aos 20°C usando o mesmo procedimento. Esse tipo de experimento só foi possível ser realizado devido ao controle rígido da temperatura feito pelo software do equipamento.

Ensaio da atividade de XET – ensaio colorimétrico

A atividade de XET foi medida através do método colorimétrico baseado na formação do complexo xiloglucano iodo/iodeto de potássio, como descrito por Alcântara (2000) utilizando placas de ELISA, com adaptações para Eppendorff.

O método original (Sulová *et al.* 1995), definido para tubos de ensaio, baseia-se na incubação de 10 µL de extratos de XET, 0,2mg de xiloglucano de *Tamarindus indica*, 20 a 40 µg de oligossacarídeos em 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,5. A incubação é interrompida pela adição de 0,1 mL de HCl 1M, seguida da adição de 1 mL de solução de Na₂SO₄ 20% e 0,2 mL de iodo-iodeto de potássio (0,5% I₂ - 1,0% KI), em cada tubo. Após 1 hora em repouso no escuro, a absorbância é determinada a 620 nm. A atividade total de degradação do xiloglucano (XDA = Xyloglucan Degradation Activity) que inclui não só a atividade de transglicosilação mas a atividade endo-hidrolítica da XET (caso utilize a água como aceptora de fragmentos) e as atividades contaminantes de possíveis endo-β-glucanases não específicas para o xiloglucano é calculada pela fórmula

$$XDA = 100(A_{(c)} - A_{(s)})/A_{(c)}$$

onde $A_{(c)}$ é a absorbância do controle sem enzima e $A_{(s)}$ é a absorbância da amostra.

O valor da atividade é expresso em unidades arbitrárias e corresponde a percentagem de xiloglucano degradado a moléculas com massa molecular inferior a 10 kDa que não reagem com o iodo-iodeto de potássio.

Para distinguir a atividade de transglicosilase de atividades de endo-β-glucanases não específicas eventualmente presentes em um extrato, foram realizados ensaios paralelos sem a adição de oligossacarídeos. A diferença entre os dois ensaios foi tomada como uma medida para a atividade líquida de transglicosilação da XET (XETA):

$$XETA = XDA_{(OLG)} - XDA_{(O)}$$

onde $XDA_{(OLG)}$ é a atividade medida na presença de oligossacarídeos e $XDA_{(O)}$ é a atividade medida em sua ausência. Para os ensaios da XET de *Hymenaea courbaril* só foi observada atividade em presença de oligossacarídeos, portanto,

$$XETA = XDA_{(OLG)}$$

A técnica adaptada, consiste na incubação de 20 µL de XET com 30 µL de xiloglucano (0,3 mg) mais 10 µL de oligossacarídeos (20 a 40 µg) e tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 durante 2 horas e com temperaturas diferentes (25, 30, 35, 38, 40 e 42 °C para *Hymenaea courbaril* com oligossacarídeos de *Hymenaea courbaril* e 30, 36, 42 e 46 °C para *Tamarindus indica* com oligossacarídeos de *Tamarindus indica*). A incubação foi interrompida pela adição de 20 µL de HCl 1M e, em seguida, foram adicionados 200 µL de Na₂SO₄ 20% mais 40 µL de I₂/KI (0,5% I₂ e 1,0% KI). Após 15 minutos de repouso em temperatura ambiente e no escuro a absorbância foi determinada a 660 nm em espectrofotômetro Shimadzu.

A diminuição do tempo de repouso para 15 minutos não proporcionou prejuízo para a precisão do ensaio.

Um outro tipo de ensaio colorimétrico, modificado a partir do descrito acima, foi feito a 35 °C e a 42 °C com a XET de *Hymenaea courbaril*. Com os mesmos volumes acima, xiloglucano de *Hymenaea courbaril* foi incubado com oligossacarídeos de *Hymenaea courbaril* e *Tamarindus indica*; o xiloglucano de *Tamarindus indica* foi incubado com oligossacarídeos de *Hymenaea courbaril* e *Tamarindus indica*. Os demais procedimentos foram mantidos.

Experimentos com HSDSC

Os experimentos com DSC de alta sensibilidade (High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry VP-DSC da MicroCal Inc.) foram realizados no Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, com auxílio e supervisão do Dr. Watson Loh. As amostras iniciais de xiloglucanos eram de 0,1% e posteriormente foram usadas concentrações de xiloglucanos a 1%. Os experimentos eram feitos na faixa de temperatura entre 10 e 70° C, aquecendo e resfriando diversas vezes. O objetivo dos experimentos foi o de poder observar algum tipo de transição no xiloglucano em temperatura fisiológica.

Experimentos com dicroísmo circular

A teoria do dicroísmo circular (CD) baseia-se na propagação ou desvio para esquerda ou direita de ondas eletromagnéticas circulares e polarizadas (LHCP – left handed circularly polarized ou RHCP – right handed circularly polarized). Se a molécula absorve essas frequências eletromagnéticas, a absorção de ondas LHCP ou RHCP não é igual. A esse efeito é dado o nome de dicroísmo circular e é caracterizado pela diferença entre os coeficientes de absorção (Cadwell *et al.* 1971 e Barron, 1982 citado por Zamastil *et al.* 1998).

Os experimentos com o equipamento de dicroísmo circular foram feitos no IBILCE – UNESP de São José do Rio Preto, no Departamento de Biofísica Molecular, com o auxílio e orientação do Dr. João Ruggiero Neto e do Dr. Marcelo Andrés Fossey. Esses experimentos visavam descobrir o tipo de hélice formada pelo xiloglucano, já que tanto “in vivo” como em solução, ele reage com o íon triiodeto, da mesma forma que o amido. O equipamento de CD utilizado (Jasco Ltd., modelo J-700) foi desenvolvido para trabalhar em comprimentos de onda acima 200 nm, isto é, com lâmpadas comerciais e sem a necessidade de elevado vácuo.

Resultados

Ensaio com iodo/iodeto de potássio.

Os ensaios de xiloglucanos com iodo/iodeto de potássio dão uma coloração azul bem forte e escura, o que caracteriza esse complexo. Isto acontece com o xiloglucano (Gaillard *et al.* 1969) da mesma maneira com o amido.

Varreduras feitas em espectrofotômetros desse complexo demonstraram que a melhor leitura, ou o pico de absorbância ocorre entre 660 a 667 nm de comprimento de onda. Esta variação de 7 nm é devida à calibração e ao tipo de equipamento utilizado (Shimadzu e HP). Um terceiro equipamento foi utilizado (Ultrospec 3300 da Amersham Biosciences) e os resultados obtidos ficaram dentro desse intervalo (665 nm). A estabilidade do complexo xiloglucano-iodo/iodeto de potássio é bem característica e altamente repetitiva. Esses resultados de ótimo de absorbância ocorrem tanto para os xiloglucanos de reserva quanto para o xiloglucano de parede primária (Figura 8).

Xiloglucano e pH

Os perfis de cada curva de pH variaram conforme a espécie de onde o Xg foi extraído. Os Xgs de *H. courbaril* e *C. langsdorffii* foram similares, aparentemente com ótimos nos pHs 3 e 4. O Xg de *T. indica* apresentou a faixa de ótimo em pH 4 e para o Xg de *T. majus* a faixa de ótimo foi mais ampla, entre 4 e 5. A diferença mais acentuada nesse último caso pode estar relacionada à presença de pequena contaminação com proteínas (Figura 9).

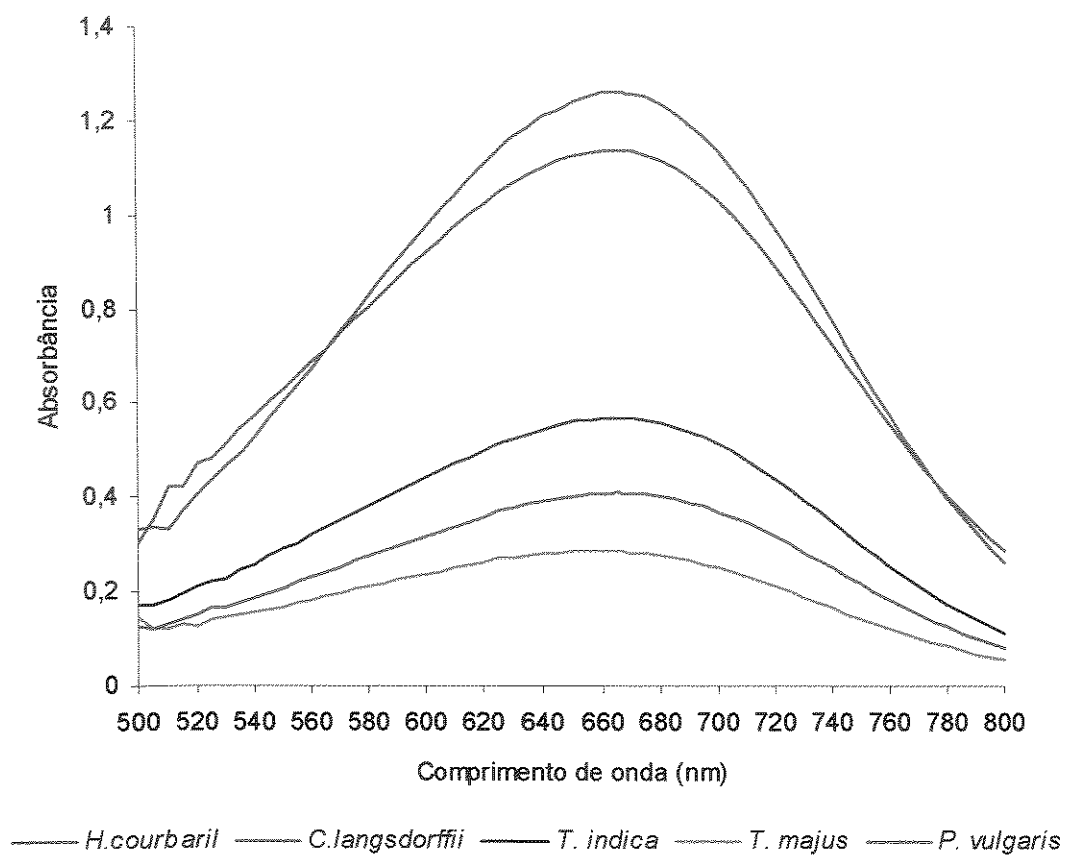


Figura 8. Varredura comparativa entre os xiloglucanos complexados com iodo/iodeto de potássio feita em espectrofotômetro HP 8453. Todos os Xgs apresentaram o pico de absorvância de 667 nm neste aparelho.

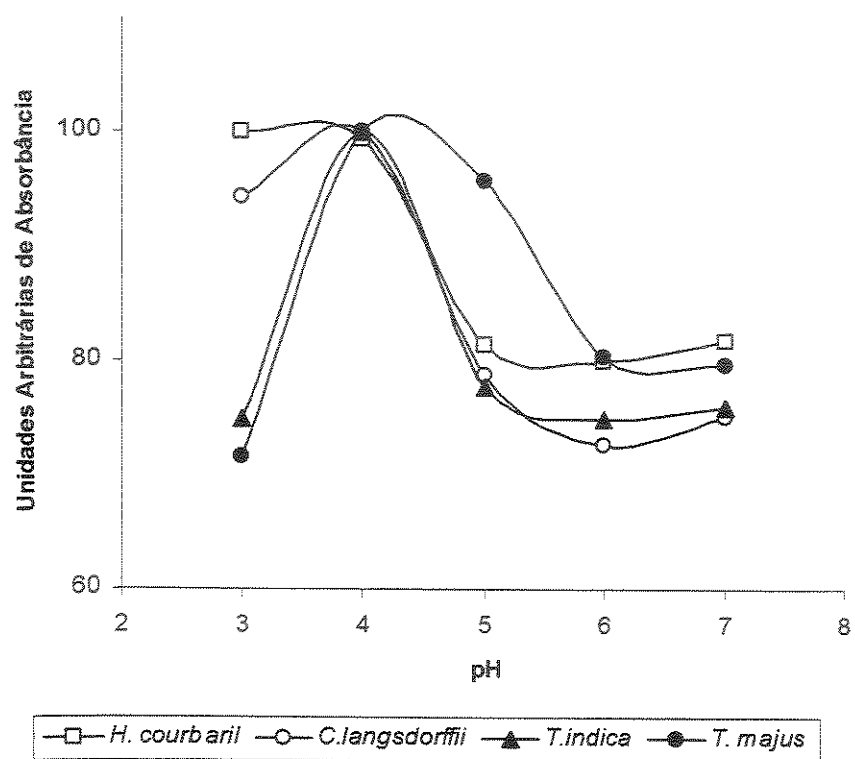


Figura 9. Efeito do pH sobre a interação de xiloglucanos de reserva com I_2/KI . Todos apresentam ótimo de interação em pH 4,0.

Xiloglucano e temperatura

Quando o complexo xiloglucano-iodo/iodeto de potássio é aquecido, mesmo em temperaturas ao redor de 100 ° C, perde a cor azul, ficando amarelo e, ao ser resfriado, volta a apresentar a coloração azul (Gailard *et. al.* 1969). Nos experimentos feitos em nosso laboratório, foi possível verificar que a velocidade com a qual o xiloglucano é resfriado determina “a renaturação” original da estrutura helicoidal. Se a velocidade de aquecimento for a mesma de resfriamento, e preferencialmente lenta, o xiloglucano complexado com o iodo/iodeto de potássio volta a apresentar uma absorbância muito próxima da inicial; já se a velocidade de resfriamento for muito rápida, a absorbância final do complexo não é tão próxima, sendo inferior a inicial. É importante ressaltar que, mesmo aquecendo e resfriando rapidamente, o pico de absorbância permanece ao redor dos 667nm.

Os resultados obtidos com os xiloglucanos, tanto de reserva quanto de parede primária de células em suspensão de feijão, sugerem que eles possuem uma temperatura de transição (T_{melt}) de conformação. Enquanto o xiloglucano de *H.courbaril* apresenta T_{melt} de aquecimento 35°C e de resfriamento 33,8°C, o de *C.langsdorffii* apresenta 40,2°C e 35,8°C, o *T.indica* 41,2° e 38,1°C, o *T.majus* 37,5° e 30,2° C e o feijão 36,1°C e 30°C respectivamente. Esses valores (Figura 10) demonstram que *H.courbaril* é que apresenta menor histerese e *T.majus* a maior.

É interessante observar que houve três classes distintas no que concerne os ciclos de temperatura e de histerese nos diferentes Xgs. *H. courbaril* foi o menor, com apenas 1,8°C de diferença entre os T_{melts} de elevação e diminuição, enquanto *C. langsdorffii* e *T. indica* apresentaram valores intermediários (3 e 4 graus C respectivamente) e *T. majus* e feijão com diferenças de 7 e 6 graus C respectivamente.

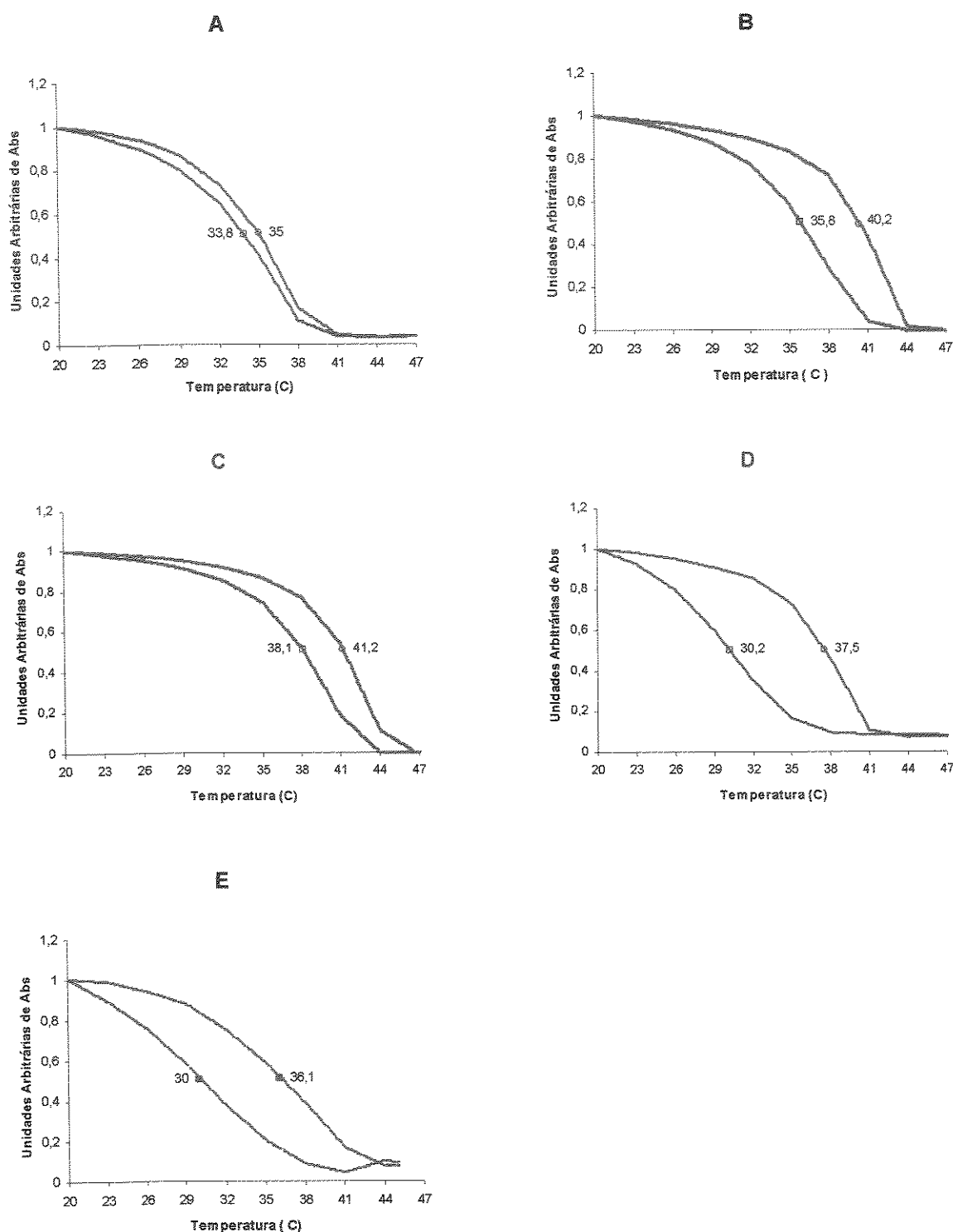


Figura 10. Gráficos de xiloglucanos complexados com I_2/KI e com ciclos de temperatura. Em A, *Hymenaea courbaril*, com a menor histerese; B, *Copaifera langsdorffii*; C, *Tamarindus indica*; D, *Tropaeolum majus*, a maior histerese; E, *Phaseolus vulgaris*. Azul = aquecimento; Violeta = resfriamento.

Xiloglucano e HSDSC

Com soluções de concentrações de 0,1; 0,5 e 1% dos xiloglucanos, foram feitos diversos experimentos, porém não foi possível observar qualquer tipo de transição. A elevação e a diminuição de temperatura foram variadas, por uma série de experimentos, de 0,5 a 1 °C por minuto. A opção em usar um HSDSC foi devido à sensibilidade muito maior em relação ao DSC comum (Figura 11).

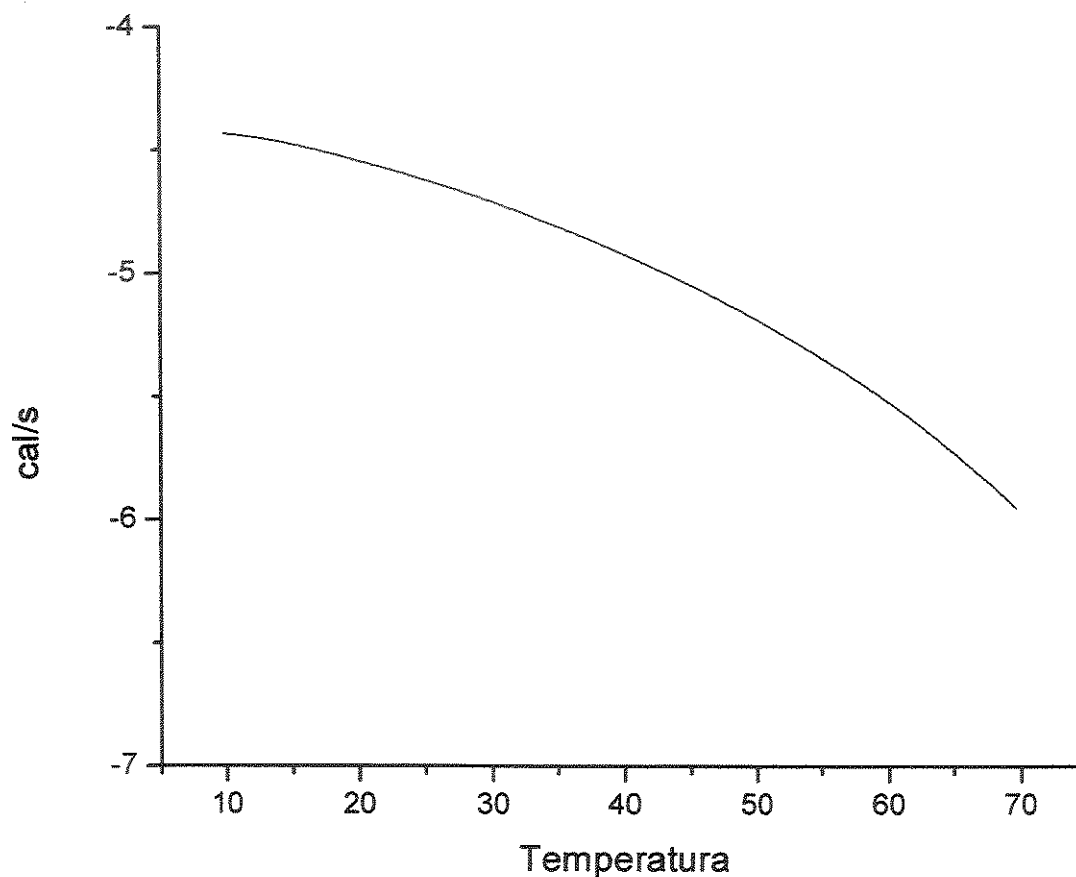


Figura 11. Resultado obtido com xiloglucano de *Copaifera langsdorffii*. Como nos demais xiloglucanos, não foi possível obter um resultado capaz de demonstrar uma transição de fase ou qualquer tipo de alteração do Xg.

Xiloglucano e CD

Os carboidratos apresentam problemas especiais para análise conformacional por CD. Diferente das proteínas, as conformações dos carboidratos, principalmente de polissacarídeos, não apresentam formas características como α -hélice, folha pregueada (β -sheet) e outras. Em solução, os carboidratos, principalmente os polissacarídeos, podem formar hélices desordenadas, partes estendidas, outras colapsadas, mas uma estrutura helicoidal pode vir a se formar, variando a abertura, ângulo e passo da hélice de acordo com os resíduos de açúcar que ela apresente (Stevens, 1996; Ress, 1982 citado por Stevens, 1996).

Procuramos utilizar um aparelho de dicroísmo circular (CD) para fazermos os experimentos. Como a grande maioria dos aparelhos de CD apresenta lâmpadas do tipo comercial, ótimas para proteínas, que atuam acima de 200 nm de comprimento de onda, não nos foi possível determinar o tipo de estrutura ou tipo de hélice formada para os xiloglucanos. Apesar disso, no limite da resolução do aparelho, foi possível observar um certo deslocamento do CD para a esquerda no xiloglucano de *H. courbaril* e um certo deslocamento para a direita em *T. indica* (Figura 12). Os outros xiloglucanos não apresentaram algo que chamasse a atenção, pois quaisquer alterações que poderiam apresentar ou que tenham apresentado, estariam provavelmente fora da faixa de sensibilidade do aparelho.

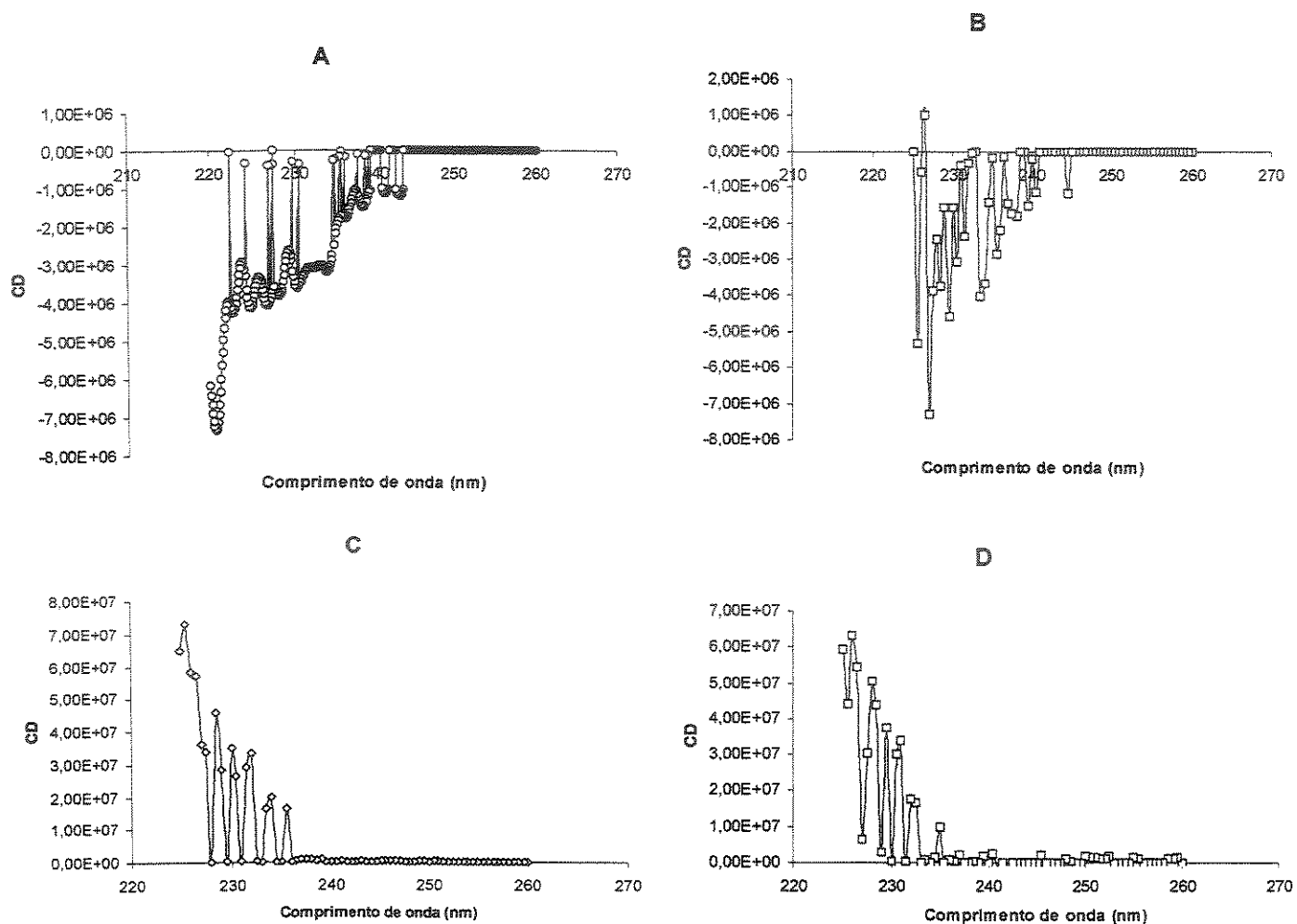


Figura 12. Experimentos de xiloglucanos em CD. Em A e B xiloglucano de *Hymenaea courbaril* deslocando-se à esquerda: A na temperatura de 15°C e B 40°C; em C e D xiloglucano de *Tamarindus indica* deslocando-se à direita: em C a 25°C e D 50°C.

Xiloglucano e enzimas

Os xiloglucanos das quatro espécies, complexados com iodo/iodeto de potássio, foram incubados com enzimas celulase (de *Trichoderma viride*), β -galactosidase (de *Copaifera langsdorffii*) e xiloglucano endo-transglicosilase (de *Hymenaea courbaril*).

A ação da celulase sobre o polímero é muito eficiente e foi possível acompanhar a hidrólise diretamente no espectrofotômetro (Figura 13), com a queda da absorbância do complexo, até não ter mais a coloração verde-azulada, característica do complexo XG/I₂/KI. Essa técnica nos permite produzir oligossacarídeos de xiloglucanos de pesos moleculares diferentes acompanhando a queda da absorbância.

Nos experimentos com β -galactosidase foi utilizado o xiloglucano de *C. langsdorffii*, pois esse apresenta maior proporção de fragmentos de XLLG e se houvesse ataque pela β -galactosidase esse provavelmente seria visto mais claramente (Alcântara et al. 1999). Entretanto, não houve ataque da β -galactosidase ao polímero (Figura 13).

Em experimentos com extrato bruto de XET (xiloglucano endo- β -transglicosilase) de *H. courbaril* demonstraram uma curva com queda da atividade enzimática conforme a temperatura é elevada, no mesmo padrão da temperatura de transição (conformacional) da estrutura nativa para a desnaturada do xiloglucano. Isso nos fez realizar novos experimentos com XET de *H. courbaril* para confirmar esse fenômeno (Figura 14A).

A estratégia seguinte foi purificar a XET de *Hymenaea courbaril* usando um FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences) para obter uma purificação mais confiável e rápida. O propósito não era determinar propriedades ou sequenciar a enzima, mas sim utilizá-la com o máximo de pureza, sem contaminação com outras enzimas de hidrólise do xiloglucano, como α -xilosidade, β -glucosidase e β -galactosidase e relacionar a sua atividade com a temperatura e a mudança conformacional da molécula de xiloglucano.

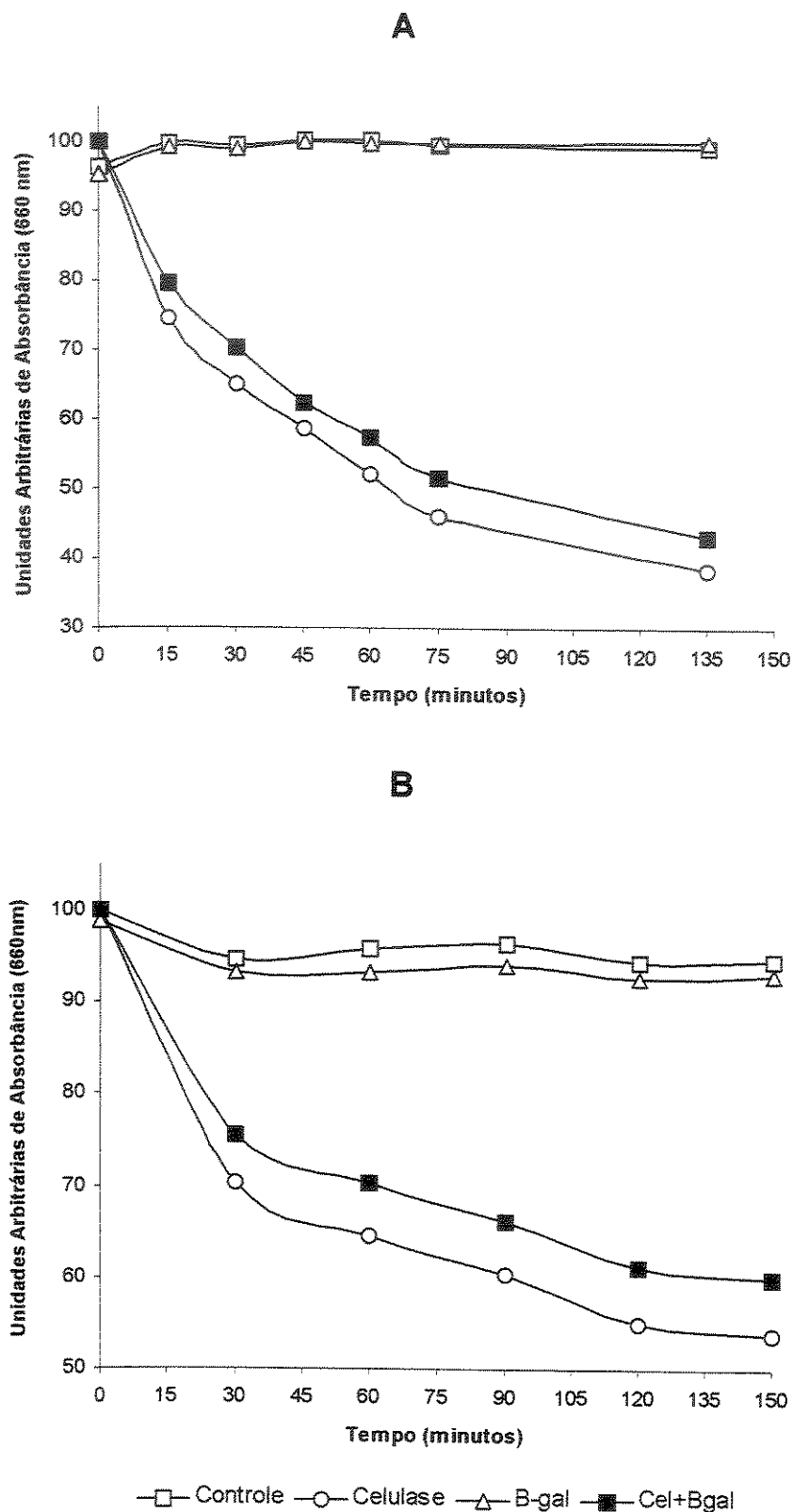


Figura 13. Ação de celulase e β -galactosidase sobre o polímero de xiloglucano. Em A sobre xiloglucano de *Hymenaea courbaril* e em B sobre xiloglucano de *Copaifera langsdorffii*.

Atividade da XET por ensaio colorimétrico e temperatura

A XET de *H. courbaril* teve a sua atividade determinada por ensaio colorimétrico em diferentes temperaturas e incubada com xiloglucano e oligossacarídeos de *H. courbaril* e também com xiloglucano e oligossacarídeos de *T. indica*. A escolha do xiloglucano de *T. indica* para ensaio foi motivada por apresentar oligossacarídeos de série ortodoxa (baseados somente em XXXG) bem conhecidos.

Nos ensaios de *H. courbaril* pode-se observar que a atividade ótima da enzima XET é máxima exatamente na mesma temperatura onde o xiloglucano está no T_{melt} e “abrindo” a hélice e liberando o íon triiodeto (35° C) (Figura 14B).

Nos ensaios de *T. indica* com a XET de *H. courbaril*, não houve ação da enzima sobre os substratos.

O segundo tipo de ensaio colorimétrico foi feito a 35°C, usando a XET e xiloglucano de *H. courbaril* tanto com oligossacarídeos de *H. courbaril* quanto de *T. indica*, apresentou hidrólise. A mesma enzima com xiloglucano de *T. indica* não apresentou ou apresentou pouca hidrólise com oligossacarídeo de *T. indica* e apresentou transglicosilação com oligossacarídeo de *H. courbaril* (Figura 15).

A Figura 14A mostra curvas de atividade e estabilidade da XET de *H. courbaril*. A enzima perde rapidamente a estabilidade quando a temperatura aumenta acima de 30 °C. No entanto, a atividade enzimática foi máxima a 35 °C, que corresponde à temperatura em que o Xg atinge o T_{melt} (Figura 10A). Em ensaios com a XET parcialmente purificada os resultados de atividades foram confirmados (Figura 14B).

Utilizando as condições de pH, temperatura e estabilidade definidas nos experimentos acima, foi realizado estudo sobre a especificidade da XET por oligossacarídeos e polissacarídeos de diferentes espécies (Figura 15).

Nesse experimento foram utilizados como doadores os polímeros de xiloglucanos de *H. courbaril* e *T. indica* e como aceptores as misturas de oligossacarídeos obtidas desses mesmos polímeros por hidrólise com celulase.

Os resultados mostraram que a XET de *H. courbaril* apresenta grande especificidade pelo doador utilizado na reação, deslocando a reação para hidrólise apenas na presença de Xg de *H. courbaril*, não importando o oligossacarídeo acceptor. Curiosamente, quando os oligossacarídeos aceptores foram os de *H. courbaril* e o polímero doador foi de *T. indica* a reação foi deslocada para transglicosilação (Figura 15).

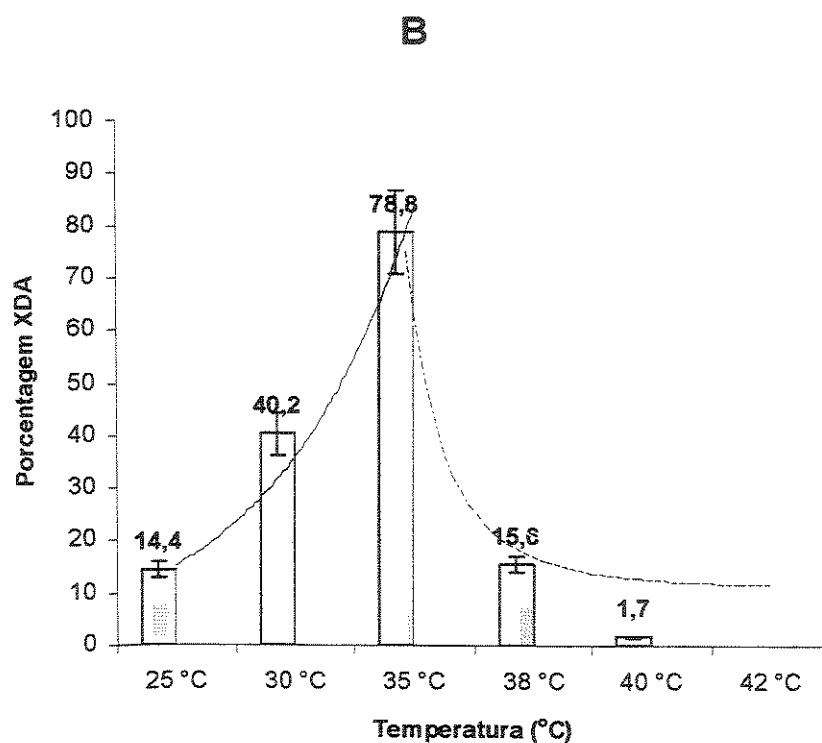
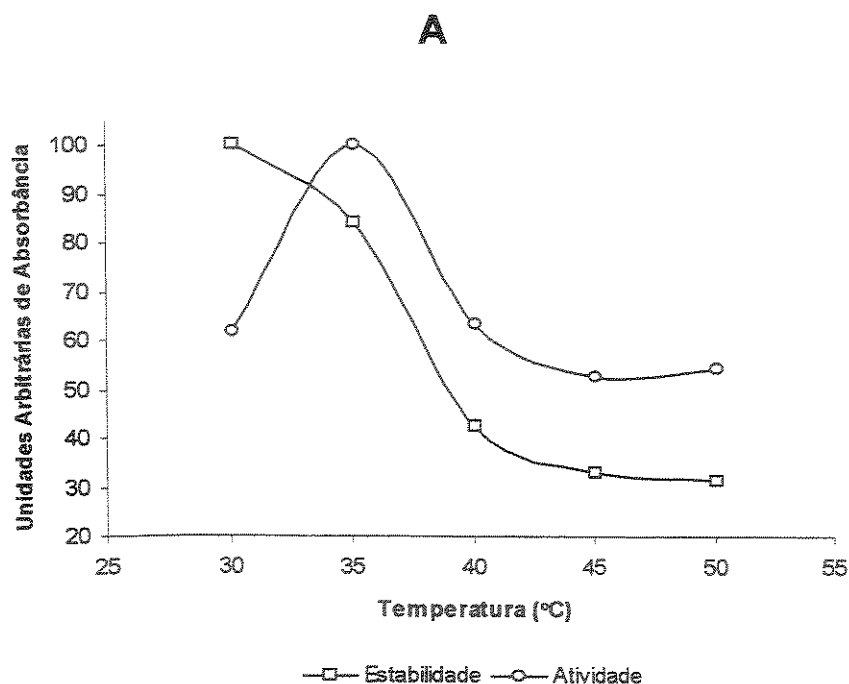


Figura 14. Atividade de XET de *Hymenaea courbaril*. Em **A** extrato bruto de XET de *Hymenaea courbaril*: o ótimo de atividade e a queda da estabilidade ocorrem a 35°C, a mesma do T_{melt} do xiloglucano de *Hymenaea courbaril*; em **B** a atividade da mesma XET em cada temperatura.

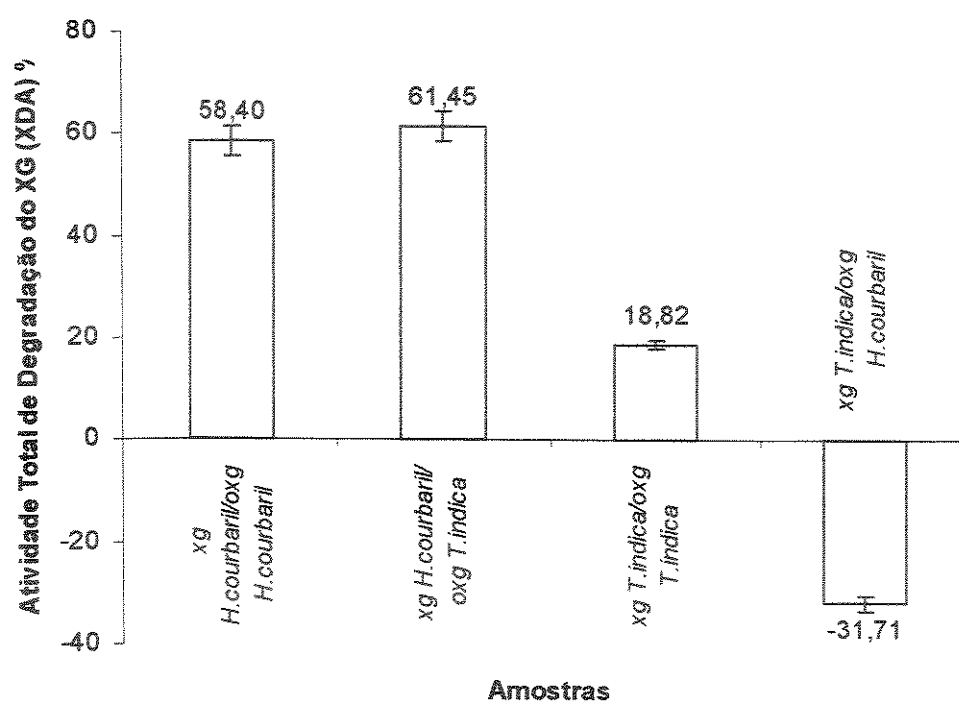


Figura 15. Ensaio colorimétrico da XET de *Hymenaea courbaril* com xiloglucanos de *Hymenaea courbaril* e *Tamarindus indica* e seus respectivos oligossacarídeos.

Discussão

Ensaio com iodo/iodeto de potássio.

A formação de complexos de coloração azul na presença de xiloglucano sugere fortemente que este polímero também possua conformação helicoidal em solução, porém com passo mais longo devido ao tipo de ligação glicosídica – β (1,4) – (Taylor *et al.* 1985) e das ramificações que este polímero apresenta. A molécula de amido apresenta ligações glicosídicas α (1,4) e suas ramificações apresentam ligações α (1,6).

Xiloglucano e temperatura

Os xiloglucanos utilizados apresentaram diferentes T_{melt} de aquecimento e resfriamento, como foi mostrado na Figura 10. O xiloglucano de *H. courbaril* apresentou uma menor histerese entre o aquecimento e o resfriamento enquanto a maior foi observada para o xiloglucano de *T. majus* (Figura 10). A absorbância inicial para todos os xiloglucanos quando do aquecimento foi praticamente idêntica a absorbância no fim do resfriamento.

Uma justificativa para esse tipo de fenômeno seria a diferença entre as estruturas finas desses polímeros, que no caso específico de *H. courbaril* poderia ser explicado pela diversidade na distribuição de oligossacarídeos galactosilados em relação às demais espécies. Tais variações foram mostradas por Lima & Buckenridge (2001) que observaram inclusive diferenças no grau de adsorção de xiloglucanos à celulose (Tabela 1).

Tabela 1- Distribuição de galactoses nas moléculas de xiloglucano, segundo Lima e Buckeridge (2000), poderia estar diretamente relacionada com a menor ou maior histerese dos xiloglucanos.

Espécies	Índice de distribuição de galactose (XLLG+XLXG)/(XLLG+XXLG)	Adsorção Xg à celulose (%)
<i>H. courbaril</i>	0,20	33,8a*
<i>T. indica</i>	0,65	30,9b
<i>T. majus</i>	0,75	26,9c
<i>C. langsdorffii</i>	0,92	26,6c

*as letras minúsculas comparam as médias de adsorção entre as espécies.

Outra possibilidade para essa menor histerese em *H. courbaril* é a presença de uma nova família de oligossacarídeos, exclusivos a essa espécie, com blocos formados por cinco moléculas de glucose (Tiné, 2002), e com diferentes distribuições das galactoses.

Uma terceira hipótese para uma diferença tão grande seria ainda a presença de uma pequena contaminação com proteínas no xiloglucano de *T. majus*, mesmo após adotar o mesmo procedimento que se mostrou eficiente para os demais xiloglucanos.

O xiloglucano de *T. indica* foi o que apresentou maior T_{melt} de aquecimento e de resfriamento. Essa característica desse xiloglucano também deve estar relacionada ao grau de galactosilação da molécula e conseqüentemente a predominância de oligossacarídeos galactosilados (Lima e Buckeridge, 2001).

Todos esses resultados sugerem que a molécula de xiloglucano, tanto de reserva quanto de parede primária de feijão, devam apresentar uma estrutura helicoidal, pois abaixo do T_{melt} complexa-se com I_2/KI , e, quando aquecida, desfaz essa estrutura. Com o resfriamento, a estrutura helicoidal é recuperada e, na presença de I_2/KI , o complexo também é recuperado. Devido à utilização do I_2/KI é possível observar essa transição, aparentemente de segunda ordem. Nessa transição, o xiloglucano aquecido deve apresentar uma forma “desnaturada” e, similarmente ao DNA, ao ser resfriado lentamente ou na mesma velocidade com que foi aquecido, acaba recuperando a conformação original. Quando o xiloglucano é rapidamente resfriado, a absorbância final não é igual nem próxima a inicial. Aparentemente há retrogradação dos xiloglucanos e precipitação de porções desses polímeros, que não solubilizam novamente.

Xiloglucano e HSDSC

O uso de um HSDSC foi para tentar demonstrar fisicamente, e sem a presença de iodo, essa transição de temperatura observada em espectrofotômetro e I_2/KI . Contudo, não foi possível detectar qualquer tipo de transição na molécula de xiloglucano com HSDSC. Para reforçar essa afirmação, em um único trabalho com xiloglucano e DSC, Yoshimura *et al.* (1999) demonstraram que xiloglucano de *T. indica*, com concentração a 2 % não apresentou transição de fase, ou qualquer tipo de sinal que mostrasse algum tipo de transição. Os dados com I_2/KI nos levam a acreditar que ocorra uma transição de primeira ordem e a variação de entalpia não é suficiente para ser detectada pelo HSDSC por apresentar uma transição de baixa energia.

Dicroísmo Circular

Segundo Stevens (1996), a faixa ideal para fazer a análise conformacional de polissacarídeos está entre 120 a 180 nm. O tipo de CD que atua nessa faixa de comprimento de onda há somente com recurso de luz sincrotron e com elevado vácuo, o que não encontramos disponível até o momento em São Paulo. O CD utilizado, com lâmpada comercial e baixo vácuo, permitiu leituras confiáveis até 200nm. Apesar disso foi possível observar um certo deslocamento do CD para a esquerda no xiloglucano de *H. courbaril* e um certo deslocamento para a direita em *T. indica*. Esses deslocamentos ocorreram em temperaturas abaixo e acima dos T_{melts} de ambas as espécies. Os demais xiloglucanos não apresentaram nenhuma indicação tão evidente quanto os de *H. courbaril* ou *T. indica*. Isso nos faz crer que quaisquer alterações que eles pudessem apresentar seriam passíveis de observação caso o equipamento atingisse a faixa ideal para polissacarídeos, isto é, de 120 a 180 nm.

Esse pequeno deslocamento, fora da faixa adequada para polissacarídeos (120 a 180 nm) faz-nos supor que seja devido ao padrão de ramificação com galactose presente em *T. indica* e a nova família de oligossacarídeos de cinco glúcoses existente em *H. courbaril* (Figura 12). Acreditamos que futuramente, com o

auxílio de um CD de luz sincrotron, seja possível determinar o tipo de estrutura conformacional (ou helicoidal) dos xiloglucanos, pois nesse tipo de equipamento pode-se realizar experimentos em comprimentos de onda inferiores a 200 nm.

Xiloglucano e enzimas

O xiloglucano é atacado com facilidade pela celulase. Foi possível acompanhar a degradação utilizando-se o I_2/KI e lendo a absorbância diretamente em espectrofotômetro. Enquanto o complexo xiloglucano-iodo/iodeto de potássio está com a cor verde-azulada é possível fazer leituras. Entretanto, conforme a celulase vai quebrando o xiloglucano, o complexo vai se desfazendo e a absorbância diminuindo até não mais ser possível obter leituras; é quando o complexo se desfaz por completo (Figura 13). Essas observações mostraram que a interação com o iodo não impede a interação da celulase com o Xg. Isso sugere que a celulase provavelmente reconhece sítios externos à hélice; conseqüentemente, as regiões da molécula de Xg que interagem com o iodo não são as mesmas que são atacadas pela celulase. A ação da celulase sobre o xiloglucano monitorada pelo iodo pode vir a ser uma ferramenta importante para a produção de fragmentos de xiloglucanos com os mais diversos pesos moleculares.

Como já foi visto por Alcântara *et al.* (1999) e Silva (2001), a β -galactosidase não tem capacidade de atacar o polímero, atacando apenas os oligossacarídeos e em posições específicas, como no modelo proposto por Tiné *et al.* (2000) e mostrado na introdução (Figura 5). Assim a β -galactosidase, como foi afirmado na introdução, provavelmente não teve a capacidade de atacar o polímero de xiloglucano, mesmo quando associada a celulase, sendo que a capacidade de remover os resíduos de galactose do xiloglucano pode ser considerada nula (Figura 13).

Os experimentos realizados com a XET visavam relacionar a transição do xiloglucano com a atividade da enzima. Os experimentos foram desenhados de tal forma que pudesse ser possível visualizar a ação da enzima e a temperatura de

transição, eliminando a influência da temperatura como responsável por qualquer alteração da atividade enzimática.

Esses resultados sugerem que quando o Xg está na “forma helicoidal” os domínios susceptíveis ao ataque enzimático pela XET não estão disponíveis. Mais do que isso, esses domínios parecem não estar disponíveis tampouco em temperaturas acima do T_{melt} . Assim, a ação enzimática da XET sobre o Xg, conforme demonstrado na Figura 14B, aumenta linearmente entre 20 e 35 °C, caindo exponencialmente acima desta temperatura. Por outro lado, acima de 35°C a queda da atividade da XET pode ser associada principalmente à desnaturação da enzima.

Com esses dados foi possível fazer uma projeção do período em que a XET participaria da mobilização do Xg, utilizando dados da temperatura da superfície de folhas de jatobá crescendo em casa de vegetação no verão (Figura 17), época preferencial em que plântulas de jatobá estão iniciando o crescimento em ambiente natural.

Posteriormente foram feitos ensaios com a XET de *H. courbaril* com xiloglucano e oligossacarídeos de *T. indica*. No regime de temperatura de transição do *T. indica*, que é de 41,8 °C, não foi observado atividade hidrolítica da XET de *H. courbaril*. Aparentemente a XET de *H. courbaril* não hidrolisa o xiloglucano de *T. indica* ou se o ataca necessitaria de um tempo de incubação superior a duas horas.

Entretanto, quando se cruzam os oligossacarídeos, isto é, xiloglucano de *H. courbaril* com oligossacarídeos de *T. indica* e vice-versa, observa-se que XET hidrolisa o xiloglucano de *H. courbaril* com oligossacarídeo de *T. indica* e essa mesma XET transglicosilava os oligossacarídeos de *H. courbaril* com xiloglucano de *T. indica* (Figura 15).

Essa especificidade da XET de *H. courbaril* ao seu próprio xiloglucano e oligossacarídeos poderia estar relacionada à temperatura de transição menor do xiloglucano de *H. courbaril*, já que é o xiloglucano de menor histerese; a presença de blocos de oligossacarídeos com cinco moléculas de glucose (Buckeridge *et al.* 1997; Tiné, 2002) e também porque é o xiloglucano de *H. courbaril* que apresenta maior proporção de sítios de ataque pela XET (Figura 16).

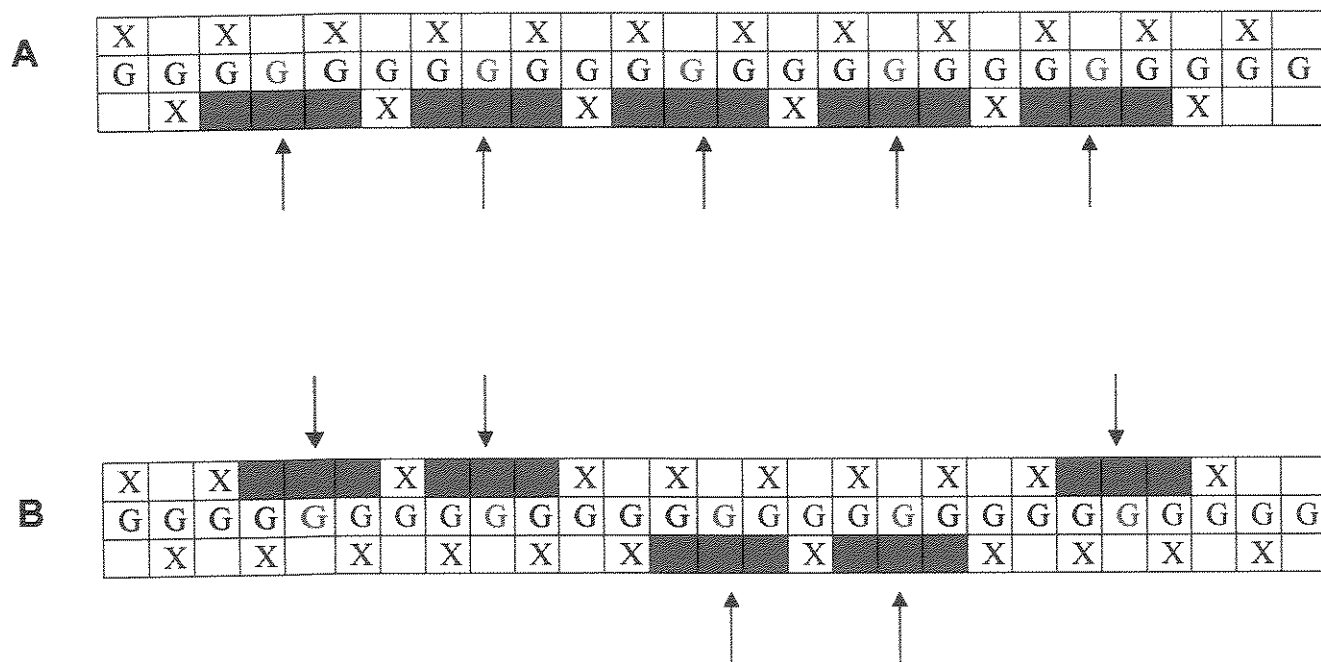


Figura 16. Comparação entre fragmentos de xiloglucanos. Em A um xiloglucano composto somente por oligossacarídeos com quatro glucoses na cadeia principal. Em B um xiloglucano com oligossacarídeos com quatro e cinco glucoses se alternando. Em azul os possíveis sítios de ataque da XET, com blocos de três glucoses e as setas e a glucose em vermelho indicam a posição hidrolisada. É possível notar em B que os sítios de ataque se alternam nos dois lados da cadeia principal. G = glucose β -(1,4); X = xilose α -(1,6), as galactoses não estão representadas. (Tiné, 2002, modificado).

A baixa hidrólise apresentada pelo Xg e oligossacarídeos de *T. indica* faz supor que na temperatura de 35 °C haveria poucos sítios de ataque disponíveis para a XET, pois essa temperatura é bem abaixo do seu T_{melt} e a estrutura helicoidal estaria ainda fechada (Figura 10C).

Já a transglicosilação observada com xiloglucano de *T. indica* com oligossacarídeos de *H. courbaril* seria pela especificidade da enzima sobre oligossacarídeos com cinco moléculas de glucose, certamente presentes, o que não ocorre no polímero de *T. indica*, e a enzima reconheceria apenas o oligossacarídeo e o adicionaria ao polímero.

Os mesmos ensaios cruzados feitos a 42 °C, próximo ao T_{melt} de aquecimento de *T. indica* (41,8 °C) não apresentaram nenhuma atividade aparente da enzima, hidrolítica ou de transglicosilação. Isso nos faz supor que, além da estrutura do xiloglucano de *H. courbaril*, a temperatura também é um fator importante na modulação da atividade da XET na semente.

No experimento de XET de *H. courbaril* com xiloglucano e oligossacarídeos de *H. courbaril*, cujo T_{melt} de aquecimento é 35°C, constatou-se que a maior atividade da XET ocorre exatamente na temperatura de transição e deve ser nesse instante que ocorre maior formação de oligossacarídeos de xiloglucano. Comparando com os ciclos diurnos de temperatura na superfície foliar (Figura 17) realizados com *H. courbaril* (H.P.Santos, L.I.V. Amaral, M.S. Buckeridge, comunicação pessoal) pode-se sugerir que a ação da XET de *H. courbaril*, e conseqüentemente das demais sementes que armazenam xiloglucano nas paredes celulares dos cotilédones, poderia ser maior durante o dia, pois a molécula de xiloglucano “abriria” e provavelmente seria mais facilmente atacada pela enzima, enquanto que, à noite, os oligossacarídeos produzidos durante o dia, sofreriam a ação da β -galactosidase e demais enzimas, como no modelo proposto por Tiné *et al.* (2000) (Figura 5).

Uma projeção especulativa similar pode ser feita considerando o xiloglucano na parede primária. Como no caso do Xg de feijão o T_{melt} (36,1°C) é similar ao de *H. courbaril* (35°C), pode-se especular que a transição de fase observada no presente trabalho possa ocorrer em paredes celulares de folhas que, durante o

desenvolvimento, poderiam também ter os períodos de expansão celular ajustados ao ritmo circadiano (Figura 17).

Os nossos resultados sugerem que a degradação do Xg da parede celular dos cotilédones poderia ser controlada pela temperatura, mais elevada durante o dia, que permitiria a quebra em grandes blocos de Xg, enquanto à noite, em temperaturas mais baixas, o metabolismo seria mais ativo e os blocos formados durante o dia seriam degradados. Sob essas condições, a mobilização do carbono vindo do Xg dos cotilédones para o crescimento da plântula não se sobreporia à fotossíntese, sendo possível que este controle seja feito pela temperatura, que daria uma eficiência maior no uso do carbono pela plântula em desenvolvimento.

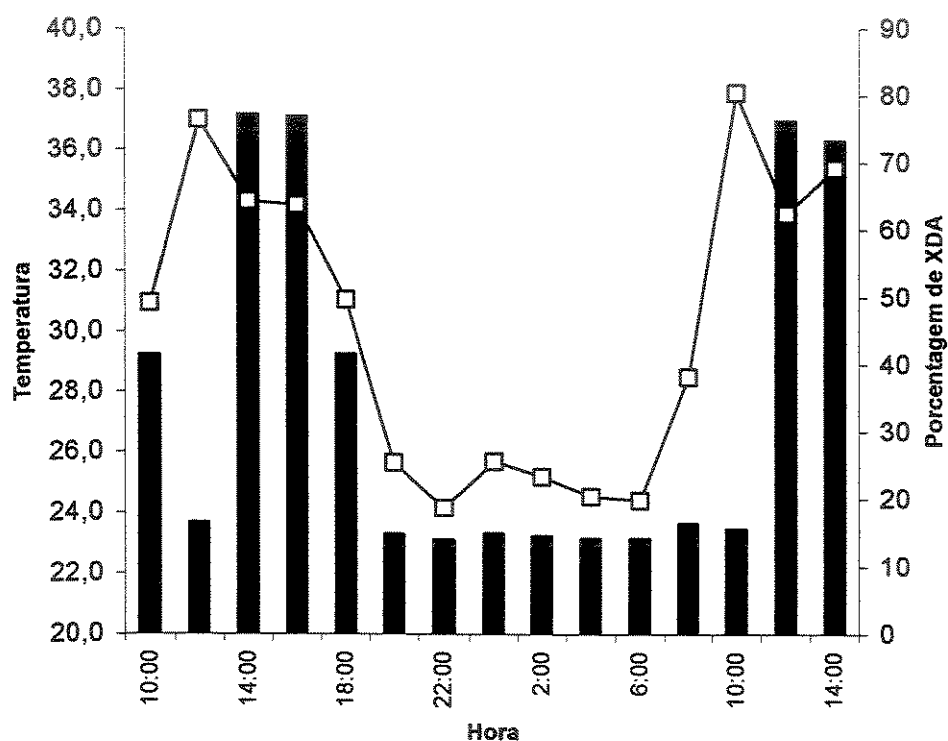


Figura 17. Variação da temperatura foliar de *Hymenaea courbaril* em relação à atividade da XET em um período superior a 24 horas (os dados de temperatura foliar foram fornecidos por H.P.Santos, L.I.V. Amaral, M.S. Buckeridge, comunicação pessoal).

Conclusões

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

A estabilidade do complexo xiloglucano – iodo/iodeto de potássio é um fato e mesmo com ciclos de elevação e diminuição de temperatura ou variação do pH, se mantém constante.

Essa estabilidade permite observar uma transição de fase na molécula do xiloglucano, em temperatura fisiológica, independentemente de ser xiloglucano de reserva ou de parede primária, porém cada um com uma temperatura de transição diferente.

O xiloglucano de reserva de sementes de *H. courbaril* apresenta menor histerese nos ciclos de temperatura e essa propriedade deve estar diretamente relacionada com a sua estrutura fina, que apresenta diferenças marcantes.

A XET (xiloglucano endo- β -transglicosilase) de *H. courbaril* tem ótimo de atividade na mesma temperatura de transição do xiloglucano dessa mesma espécie. Este ótimo de temperatura ocorre durante o dia e deve estar diretamente associado ao ritmo circadiano de degradação das reservas nos cotilédones.

A XET de *H. courbaril* apresenta alta especificidade de substrato para poder atuar, isto é, tem preferência pelo xiloglucano e pelos oligossacarídeos de *H. courbaril*.

BIBLIOGRAFIA

1. Alcântara, P.H. (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.
2. Alcântara, P.H., Dietrich, S.M.C., Buckeridge, M.S., (1999). *Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii**. **Plant Physiology Biochemistry**, 37(9): 653-663.
3. Bates, F.L. et al. (1943). **Journal of American Chemistry Society**, 65: 142. APUD Gailard et. al. 1969
4. Brown, Jr., R.M.; I. M. Saxena and Kudlicka, K. (1996). *Cellulose biosynthesis in higher plants*. **Trends in Plant Sciences**. Vol. 1 (5) (149-156).
5. Buckeridge, M.S. e 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.
6. Buckeridge, M.S., Crombie, H.J., Mendes, C.J.M., Reid, J.S.G., Gidley, M.J. e Vieira, C.J. (1997). *A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (leguminosae) cotyledons*. **Carbohydrate Research**. 928.
7. Buckeridge, M.S., Rocha, D.C., Grant Reid, J.S., Dietrich, S.M.C. (1992). *Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations*. **Physiologia Plantarum**. 86: 145-151.
8. Buckeridge, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. (2000a). *Mobilisation of storage polisaccharides in seeds*. **Plant Physiology Biochemistry**. 38(1/2):141-156.
9. 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
10. Carpita, N.C. e 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*. **The Plant Journal**, 3(1):1-30.
11. Carpita, N; McCann, Maureen (2001) in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants – Chapter 2*, Buchanan et al. **American Society of Plant Physiologists**. 52-108.
12. Crombie, HJ, Chengappa, S. Hellyer, A. e 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*. **The Plant Journal**. 15(1), 27-38.

13. 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. **Journal of Biological Chemistry**, **263**(9): 4333-4337.
14. Edwards, M., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V. e Grant Reid, J.S. (1985). Xyloglucan (amyloid) mobilization in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. **Planta**, **163**: 133-140.
15. Edwards, M., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V. e Grant Reid, J.S.. (1986). Purification and properties of a novel xyloglucan-specific endo-(1,4)-beta-D-glucanase from germinating nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.). **Journal of Biological Chemistry**. **261**, 9489-9494.
16. Fanutti, C., Gidley, M.J. e Reid, J.S. (1993). Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-(1,4)-beta-D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. **The Plant Journal**. **3**: 691-700.
17. Fanutti, C., Gidley, M.J. e Reid, J.S.,(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-glucanase and other hydrolases during storage xyloglucan mobilization. **Planta**. **184**, 137-147.
18. Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J-P., Kato, Y., Pérez Lorences, E., MacLachlan, G.A., McNeil, M., Mort, A.J., Reid, J.S.G., Seitz, H.U., Selvendran, R.R., Voragen, A.G.J., White, A.R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiologia Plantarum** **89**: 1-3.
19. Gailard, Thompson e Morak, (1969).The interaction of polisaccharides with iodine. **Carbohydrate Research**, **11**: 509-519
20. Hayashi, T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. **40**:139-168.
21. Jones, L., Atkins, P.W. (1999). *Chemistry – Molecules, Matter and Changes*, 4 Edition. W.H. Freeman and Company. Chapter 20, 900-907.
22. Kooiman, P. (1960). On the occurrence of amyloids in plant seeds. **Acta Botânica Neerl.** **9**: 208-219.
23. Kooiman, P., (1961). The Constituiton of *Tamarindus*-Amyloid. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas**, **80**: 849-865.
24. Le Dizet, P. (1972). Quelques precisions sur la structure de l'amyloide de capucine. **Carbohydrate Research** **24**, 505-509. APUD Buckeridge et. al. 1996.
25. Levy, S., MacLachlan, G. e Staehelin, L.A. (1997). Xyloglucan sidechains modulate binding to celulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. **The Plant Journal**, **11**(3): 373-386.

26. Levy, S., York, W.S., Stuike-Prill, R., Meyer, B. e Staelin, A. (1991). *Simulations of the static and dinamica molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosilated sidechain in surface-specific sidechain folding. The Plant Journal*, **1**(2): 195-215.
27. Lima, D.U., Buckeridge, M.S., (2001) *Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. Carbohydrate Polymers*, **46**: 157-163.
28. Lima, N.N., Reicher, F., Corrêa, J.B.C., Ganter, J.L.M.S., Sierakowski, M.R. (1993). *Partial structure of a xyloglucan from the seeds of Hymenaea courbaril var Stilbocarpa (jatobá). Ciência e Cultura*, **45**(1): 22-26.
29. Mauseth, J.D. (1998) in *Botany – an Introduction of Plant Biology*, 2/e – Chapter 3, 77-82.
30. Niklas, Karl J. (1997) *The Evolutionary Biology of the Plants*. The University of Chicago.
31. Nishitani, K. e Tominaga, R., (1991). *In vitro molecular weight increase in xyloglucans by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of Vigna angularis. Physiologia Plantarum*. **82**: 490-497
32. Rundle, R.E. et al. (1943). *Journal of American Chemistry Society*, **65**: 544-557; 558-561; 1707-1710; 2200-2203. APUD Yu et al. (1996).
33. Sampedro, J et. Al. (2001). *Cloning and expression pattern of a gene encoding an α -xylosidase active against xyloglucan oligosaccharides from Arabidopsis. Plant Physiology*, **126**: 910-920.
34. Shirikawa, M., Yamatoya, K., Nishinari, K. (1998). *Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme. Food Hydrocolloids*. **12**: 25-28.
35. Silva, C. S. (2001). *Papel da β -galactosidase no mecanismo de degradação do xiloglucano de parede celular durante a mobilização de reserva em cotilédones de Copaifera langsdorffii. UNICAMP*, Campinas. Dissertação de Mestrado. 58p.
36. Stevens, E.S., (1996). in *Circular Dichroism and th Conformational Analysis of Biomolecules, Chapter 14*, Fasman, G.D.. **Plenum Press**. 501-530.
37. Sulová, Z et al. (2001). *Release of complexed xyloglucan endotransglycosylase (XET) from plant cell walls by a transglycosylation reaction with xyloglucan-derived oligosaccharides. Plant Physiology and Biochemistry*, **39**: 927-932.
38. Sulová, Z., Lednická, M., Farkas, V (1995). *A colorimetric assay for xyloglucan-endotransglycosylase from germinating seeds. Annals of Biochemistry*, **229**: 80-85.
39. Taylor, I.E.P., Atkins, E.D.T., (1985). *X-ray diffraction studies on the xyloglucan from tamarind (Tamarindus indica) seed. Federation of European Biochemical Societies*, **181**(2): 300-302.
40. Tiné, M.A.S. (1997). *Mobilização de xiloglucano de reserva em sementes de Hymenaea courbaril L. UNICAMP*, Campinas. Dissertação de Mestrado. 85p.
41. Tiné, M.A.S. (2002). *O conteúdo informacional da molécula de xiloglucano de cotilédones de Hymenaea courbaril reflete suas funções em nível celular. UNICAMP*, Campinas. Tese de Doutorado. 106p.
42. Tiné, M.A.S., Cortelazzo, A.L. e Buckeridge, M.S, (2000), *Xyloglucan mobilisation in cotiledons*

- of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Plant Science**. **154**: 117-126
43. Vincken, J.P., Keizer, A., Beldman, G. E Voragen, J. (1995). *Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose*. **Plant Physiology** **108**: 1579-1585.
 44. Yamanaka, S et. al. (2000). *Gelation of tamarind seed polysaccharide xyloglucan in the presence of ethanol*. **Food Hydrocolloids**, **14**: 125-128.
 45. Yoshimura, M., Takaya, T., Nishinari, K. (1999) *Effects of xyloglucan on the gelatinization and retrogradation of corn starch as studied by rheology and differential scanning calorimetry*. **Food Hydrocolloids** **13**: 101-111.
 46. Yu, X et al. (1996). *The complex of amylose and iodine*, **Carbohydrate Research**, **292**: 129-141.
 47. Zamastil, J et al. (1998). *New approach to the theory of Circular Dicroism*. **Collect. Czech. Chem. Commun**, **63**: 1187-1201.