

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA GENTIOEXAOSE OBTIDA DE BOTRIOSFERANA POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL

Iara Ribeiro Silva, Nilson Kobori Monteiro, Paula Felipe Martinez, Nataly Lino Izeli, Ana Flora Dalberto Vasconcelos, Marilsa de Stefani Cardoso e Maria de Lourdes Corradi da Silva*

Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, CP 467, 19060-900 Presidente Prudente – SP, Brasil

Aneli de Melo Barbosa

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina – PR, Brasil

Robert F. H. Dekker

Universidad de Castilla-La Mancha – IRICA, 13071 Ciudad Real, España

Gil Valdo José da Silva e Luís Alberto Beraldo de Moraes

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901 Ribeirão Preto – SP, Brasil

Recebido em 27/2/07; aceito em 11/10/07; publicado na web em 9/4/08

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A GENTIOHEXAOSE OBTAINED FROM BOTRYOSPHERAN BY PARTIAL ACID HYDROLYSIS. A hexa-oligosaccharide was obtained by partial acid hydrolysis from botryosphaeran, an exopolysaccharide (EPS) $\beta(1\rightarrow3; 1\rightarrow6)$ -D-glucan type, produced by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria rhodina*. The oligosaccharide was purified by gel filtration and charcoal-Celite column chromatography and the analysis was followed by HPAEC/PAD. The structure was determined by NMR spectroscopy and mass spectrometry, which showed that the oligosaccharide consists of six β -D-glucopyranosyl units O-6 substituted (gentiohexaose).

Keywords: oligosaccharide; partial acid hydrolysis; β -glucan.

INTRODUÇÃO

Botriosferana é um exopolissacarídeo (EPS) do tipo β -D-glucana, produzido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, quando cultivado em glucose¹ como fonte única de carbono. O polímero foi caracterizado como uma $\beta(1\rightarrow3; 1\rightarrow6)$ -D-glucana com aproximadamente 22% de ramificações, as quais consistem de resíduos glucosídicos e gentiobiosídicos, vinculados à cadeia principal por ligações tipo $\beta(1\rightarrow6)$.²

O botriosferana foi também obtido quando cultivado em outras fontes de carbono (frutose, galactose, manose, lactose, sacarose, melão de cana-de-açúcar), com a maior produção ocorrendo em sacarose.³ O EPS produzido em frutose apresentou mais ramificações (31%) que aquele obtido em sacarose (21%), o qual foi semelhante ao EPS produzido em glucose.⁴

Algumas β -glucanas não celulósicas têm sido avaliadas quanto ao seu potencial biológico e podem apresentar atividade anti-tumor, anti-inflamatória e imunomoduladora.⁵⁻⁷ Estudos recentes demonstraram que o botriosferana não é mutagênico e possui em torno de 82% de atividade antimutagênica.⁸ Oligossacarídeos pequenos também podem influenciar positivamente o sistema imune.⁹

Existem peculiaridades estruturais das β -glucanas responsáveis pela baixa solubilidade em água e formação de soluções viscosas, que dificultam a aplicação clínica destes biopolímeros. A fragmentação destas moléculas pela utilização de enzimas resolve o problema da solubilidade e certos fragmentos podem reter a atividade biológica.¹⁰ O botriosferana foi utilizado como substrato para a

produção de β -1,3-glucanases por *Botryosphaeria rhodina* e *Trichoderma harzianum* Rifai. A forma de atuação de ambas as β -glucanases foi diferente, de acordo com os produtos de hidrólise.^{10,11}

Uma outra forma de obtenção de oligossacarídeos pode ser a hidrólise ácida parcial de β -glucanas. O tipo de ácido, sua concentração e as condições de hidrólise (tempo e temperatura) devem ser padronizados para se obter os oligossacarídeos de interesse.¹²

Recentemente verificou-se que muitos oligossacarídeos, principalmente aqueles com seis ou mais unidades monossacarídicas, conservam ou até mesmo potencializam as propriedades biológicas de seus polímeros. Uma possível explicação para essa constatação é a melhor solubilidade dos oligossacarídeos quando comparados às suas moléculas nativas, bem como ao tamanho dos oligossacarídeos e a manutenção da conformação da molécula original. Novas funções fisiológicas importantes que beneficiam a saúde humana têm sido descritas para os oligossacarídeos, incluindo-se um efeito imunomodulador na prevenção de alergia e de câncer.^{13,14}

O presente trabalho descreve, pela primeira vez, a purificação e caracterização química de um hexaoligossacarídeo obtido por hidrólise ácida parcial da β -glucana produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, denominado botriosferana.

PARTE EXPERIMENTAL

Manutenção do *Botryosphaeria rhodina* e preparo do inóculo para a produção do botriosferana

O fungo foi mantido em BDA (batata-dextrose-ágar) inclinado, a 4 °C, com repiques trimestrais.

*e-mail: corradi@fct.unesp.br

Para o preparo do inóculo, o fungo foi transferido para o meio sólido de sais de Vogel¹⁵ contendo ágar a 20 g/L (m/v) e glucose 10 g/L (m/v). As placas foram incubadas durante 5 dias a 28 °C em estufa bacteriológica. Pequenas porções de hifas foram transferidas para dois erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio de Vogel¹⁵ e 5 g/L (m/v) de glucose. Os cultivos foram mantidos sob agitação constante a 180 rpm por 48 h, a 28 °C. Em seguida, os micélios foram tratados em um homogeneizador de células, à velocidade máxima, durante 30 s. O homogenato de células foi centrifugado durante 10 min a 7000 xg, os sobrenadantes decantados e o precipitado foi ressuscitado em uma solução de salina fisiológica estéril, até se obter um valor de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm.

Produção da β -glucana botriosferana

Os cultivos foram desenvolvidos em frascos de erlenmeyer de 2000 mL contendo 400 mL de meio de Vogel¹⁵ e 50 g/L (m/v) de glucose. Cada frasco foi inoculado com 16 mL da solução do homogenato de células descrito no item anterior. Os frascos foram agitados a 180 rpm, durante 72 h a 28 °C. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (7000 xg/10 min) a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados em banho de gelo e dialisados (MWCO 12000 Da), exaustivamente, contra água destilada. Em seguida, as frações retidas no tubo de diálise foram tratadas com três volumes de etanol absoluto, previamente gelado a 4 °C, para precipitar o EPS botriosferana. Depois de mantido por, no mínimo, 2 h em câmara fria a 4 °C, o EPS foi ressuscitado em água destilada e novamente dialisado com água destilada para eliminar todo o etanol e, em seguida, liofilizado. Estas preparações foram utilizadas para os procedimentos de quantificação de açúcares totais¹⁶ e redutores.^{17,18}

Hidrólise ácida parcial do botriosferana¹⁹

À massa total de exopolissacarídeo (240 mg) foram adicionados 240 mL de TFA 0,2 M, em tubo próprio para hidrólise. A solução resultante, viscosa, sofreu curtos períodos de agitação mecânica e então foi colocada em estufa a 100 °C por 240 min. Periodicamente, o tubo era retirado da estufa e agitado para melhor solubilização da amostra. Decorrido o tempo, o TFA foi removido por evaporação, sob baixa pressão, a amostra foi lavada com porções de água destilada, seguida de evaporação até eliminação total do ácido. O hidrolisado parcial resultante foi solubilizado em água e o material insolúvel foi centrifugado a 7500 xg por 30 min. O sobrenadante, ainda turvo, foi tratado com três volumes de etanol absoluto gelado e mantido a 4 °C, durante a noite. O sobrenadante etanólico, que continha os oligossacarídeos e o precipitado, que continha o polissacarídeo residual, foi separado por centrifugação à 7500 xg/30 min. Ambos foram evaporados até secura, para eliminar todo o álcool e, em seguida, solubilizados em água deionizada. Posteriormente, alíquotas foram retiradas para serem quantificados os carboidratos totais e então analisados por HPAEC/PAD (*high performance anionic exchange chromatography-pulsed amperometric detector*).

Purificação por métodos cromatográficos dos fragmentos oligossacarídicos obtidos por hidrólise ácida parcial do botriosferana

Cromatografia de gel permeação em Sephadex G-15

O hidrolisado foi solubilizado em água destilada e aplicado em uma coluna de vidro (103,0 x 0,8 cm) preenchida com gel Sephadex G-15. Água destilada foi utilizada como eluente e o fluxo de opera-

ção da coluna foi de 0,8 mL/min. Frações de 1,4 mL foram coletadas e alíquotas de cada uma das frações foram analisadas para detectar açúcares totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico.¹⁶

Após a determinação do perfil de eluição, as frações referentes aos picos distintos de açúcares foram reunidas e liofilizadas.²⁰

Cromatografia em coluna de carvão-Celite^{21,22}

Partes iguais de carvão ativado, pó fino, (marca Riedel) e Celite foram misturadas com água. A mistura resultante, na forma de “papa”, foi adicionada à coluna de vidro. Para a remoção de traços de metais a coluna empacotada foi lavada, lentamente, com HCl concentrado e, em seguida, com água até pH neutro.

Duas colunas de carvão-Celite foram utilizadas para separar o material de interesse, obtido previamente pela cromatografia de gel permeação (pico A). A primeira coluna de carvão-Celite (28 x 2,5 cm) foi eluída com um gradiente descontínuo de etanol-água (v/v) 20, 25 e 30%, fluxo de operação de 0,34 mL/min e frações de 1,4 mL; a segunda coluna (16,7 x 1,2 cm) foi eluída com etanol-água (v/v) 26, 28 e 30%, fluxo de operação 0,50 mL/min e frações de 2,0 mL, objetivando purificar a fração de interesse (etanol-água 30%), separada pela primeira coluna.

Análise dos oligossacarídeos²³

Todas as frações procedentes das cromatografias de gel permeação e carvão-Celite foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão, em sistema Dionex DX 500 com detector de amperometria pulsada (PAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600.

Os oligossacarídeos foram separados com um gradiente de acetato de sódio (3 a 40%), em uma coluna analítica CarboPac PA100 (4 x 250 mm) equipada com uma guarda coluna PA100, à velocidade de fluxo de 1,0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas com acetato de sódio 500 mM (eluente 1) e NaOH 100 mM (eluente 2), este último preparado a partir de solução de NaOH 50%.

Após cada corrida cromatográfica (70 min) a coluna foi regenerada, utilizando-se 100% do eluente 1 (10 min) e então, antes de nova injeção da amostra,^{24,25} foi equilibrada por 15 min nas condições iniciais da corrida (3% do eluente 1).

Análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹H) e de carbono treze (RMN ¹³C)

Previamente à análise, o oligossacarídeo em estudo foi dissolvido em óxido de deutério (99,9 atom% ²H) em uma concentração de 1,0 mg/mL, sendo submetido, durante a análise, a uma temperatura de 300 °K.

Os espectros de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Bruker DRX 500 (freq. ¹H = 500.13 MHz), equipado com uma sonda de 2,5 mm com gradiente de campo no eixo z. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, relativos ao padrão interno acetona (δ ¹H: 2,22 ppm e δ ¹³C: 30,2 ppm). As análises por RMN envolveram técnicas bidimensionais: ¹H - ¹H COSY (aquisição: 2048 x 256 pontos de dados, 32 transientes; largura: 4921 Hz em ambas dimensões; espectro processado: 1024 x 1024 pontos), ¹H - ¹³C HMQC (aquisição: 1024 x 256 pontos de dados, 120 transientes; largura: 4921 Hz em F2 e 20833 Hz em F1; espectro processado: 1024 x 1024 pontos).

Espectrometria de massa

As análises por espectrometria de massas foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de massa Q-ToF (Micromass,

Manchester, UK) do tipo híbrido *quadrupole time of flight* (TFO) de alta resolução (7.000) e sensibilidade (5 ppm), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). As condições de trabalho para o ESI positivo e negativo foram as seguintes: gás de solvatação (nitrogênio) a 250 °C; capilaridade 3,2 kV e cone de voltagem 25 kV. Os espectros de massas de MS/MS foram adquiridos através da seleção de massa em Q1, seguida da dissociação induzida por colisão com argônio em q2 e a análise de massas dos fragmentos no TOF. O extrato bruto foi dissolvido em uma mistura de MeOH/D₂O 2:1 (v/v) e acetato de amônio 10 mM para análises em ambos os modos de íons positivo e negativo. A amostra foi introduzida na fonte de *electrospray* com uma bomba de seringa com fluxo de 10 µL/min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O botriosferana é um exopolissacarídeo produzido pelo *Botryosphaeria rhodina* cuja estrutura já foi caracterizada por Barbosa e colaboradores² como uma glucana constituída de uma cadeia principal β (1→3) com ramificações no carbono 6. O grande inconveniente e limitação na aplicação deste EPS está em sua baixa solubilidade em água (0,3 g%); entretanto, essa situação pode ser contornada se a molécula original for degradada a fragmentos menores, que certamente serão solúveis em água. Neste trabalho, foi determinada uma condição de hidrólise para obtenção de oligossacarídeos a partir do botriosferana.

Há poucos artigos na literatura sobre a obtenção de oligossacarídeos por hidrólise ácida parcial de polímeros em comparação àqueles que tratam de hidrólise enzimática, esta última altamente específica quanto às ligações glicosídicas a serem rompidas.²⁶ Porém, a grande vantagem da hidrólise ácida está na possibilidade de ser realizada em temperaturas elevadas promovendo maior fluidez de soluções viscosas. Geralmente, após seleção do melhor ácido bem como de sua concentração, tempo e temperatura de reação, através de curvas de hidrólise apropriadas, é possível gerar di-, tri- e oligossacarídeos maiores.^{19,27}

Segundo Bao e colaboradores,¹⁹ a fragmentação parcial de um polímero original pode ser realizada por hidrólise com ácido trifluoroacético (TFA), utilizado neste trabalho, que apresenta como vantagem sobre os demais ácidos a sua remoção por evaporação sob pressão reduzida. O desenvolvimento de uma cinética de tempo estabeleceu 240 min como ideal para obtenção de oligossacarídeos maiores. Oligossacarídeos com grau de polimerização entre 5 e 7 unidades mantêm a atividade biológica do polímero original,^{13,28} desde que a conformação da molécula seja preservada.

Após o tempo de reação, o hidrolisado foi analisado por cromatografia líquida de íons acoplada a um detector de amperometria pulsada (HPAEC/PAD) sendo caracterizado como uma mistura de oligossacarídeos (Figura 1) de diferentes massas moleculares, provenientes da fragmentação aleatória promovida pelo ácido.

Foram selecionados dois métodos cromatográficos para a separação dos oligossacarídeos, filtração em gel e carvão-Celite, à pressão normal.

O hidrolisado foi aplicado a uma coluna de filtração em gel Sephadex G-15 e o perfil de eluição dos oligossacarídeos foi acompanhado por HPAEC/PAD (Figura 2). O fragmento de menor massa molecular, com tempo de retenção semelhante à glucose, foi eluído no segundo pico (B), e os de maior massa molecular no primeiro pico (A). Apesar da cromatografia de gel permeação à pressão normal não ter sido eficiente na separação dos diferentes oligossacarídeos foi, entretanto, capaz de separar o componente monossacarídico, quantitativamente predominante no hidrolisado, das moléculas de maior massa. O pico A, contendo os fragmentos maiores, foi separado para dar seqüência ao estudo.

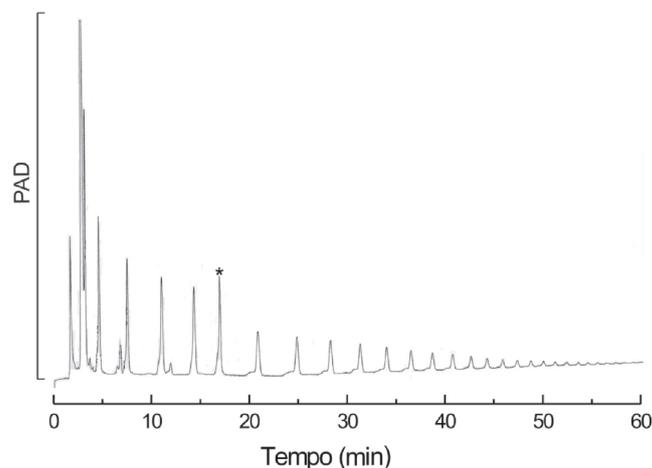


Figura 1. Análise por HPAEC/PAD do hidrolisado ácido parcial do botriosferana. Condições da hidrólise: TFA 0,2 M, 100 °C, 4 h; coluna analítica CarboPac PA100; material aplicado: 1,1 µg de açúcares totais em 25 µL. * representa componente com $R_t = 16,7$ min

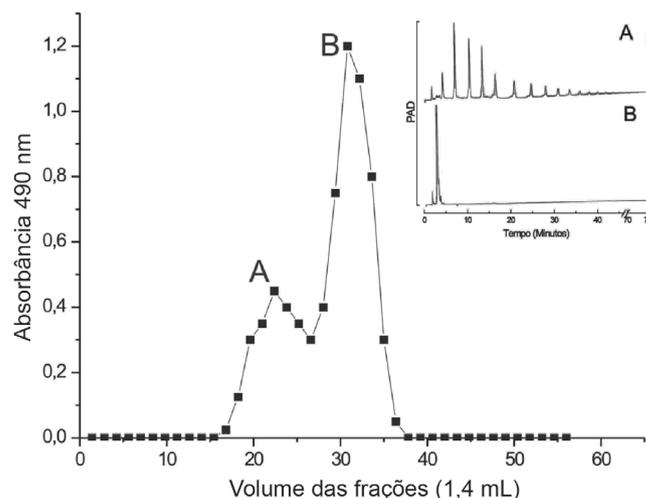


Figura 2. Cromatografia de gel permeação do hidrolisado ácido parcial do botriosferana em coluna de gel Sephadex G-15. Dimensões da coluna: 103 x 0,8 cm; eluente: água; fluxo: 0,8 mL/min; volume da fração: 1,4 mL. Picos A e B analisados por HPAEC/PAD em coluna analítica CarboPac PA 100

De acordo com Whistler e BeMiller,²¹ a cromatografia de adsorção em carvão-Celite pode ser utilizada com sucesso na separação de séries homólogas de oligossacarídeos geralmente pela utilização de um gradiente etanol-água. Corradi da Silva e colaboradores²² separaram, eficientemente, uma série homóloga de oligossacarídeos provenientes de um extrato metanol-água do líquen *Parmotrema cetratum*; posteriormente essas moléculas foram caracterizadas por RMN de próton e espectrometria de massa como di-, tri-, tetra- e penta-gentiloligosacarídeos.

A solução aquosa de oligossacarídeos (pico A, Figura 2) foi aplicada a uma coluna de carvão-Celite (Figura 3-A) e eluída com um gradiente descontínuo de etanol-água (20, 25 e 30%). O acompanhamento dos eluatos por HPAEC/PAD mostrou que a fração eluída com etanol-água 30% (Figura 3-A₁) era constituída por um material quase puro. Esta foi recromatografada em coluna semelhante (Figura 3-B) e um componente com tempo de retenção de 16,76 min foi eluído com etanol-água 28% (Figura 3-B₁), com rendimento de 5% em relação ao total de oligossacarídeos (39,0 mg) obtidos na hidrólise ácida parcial.

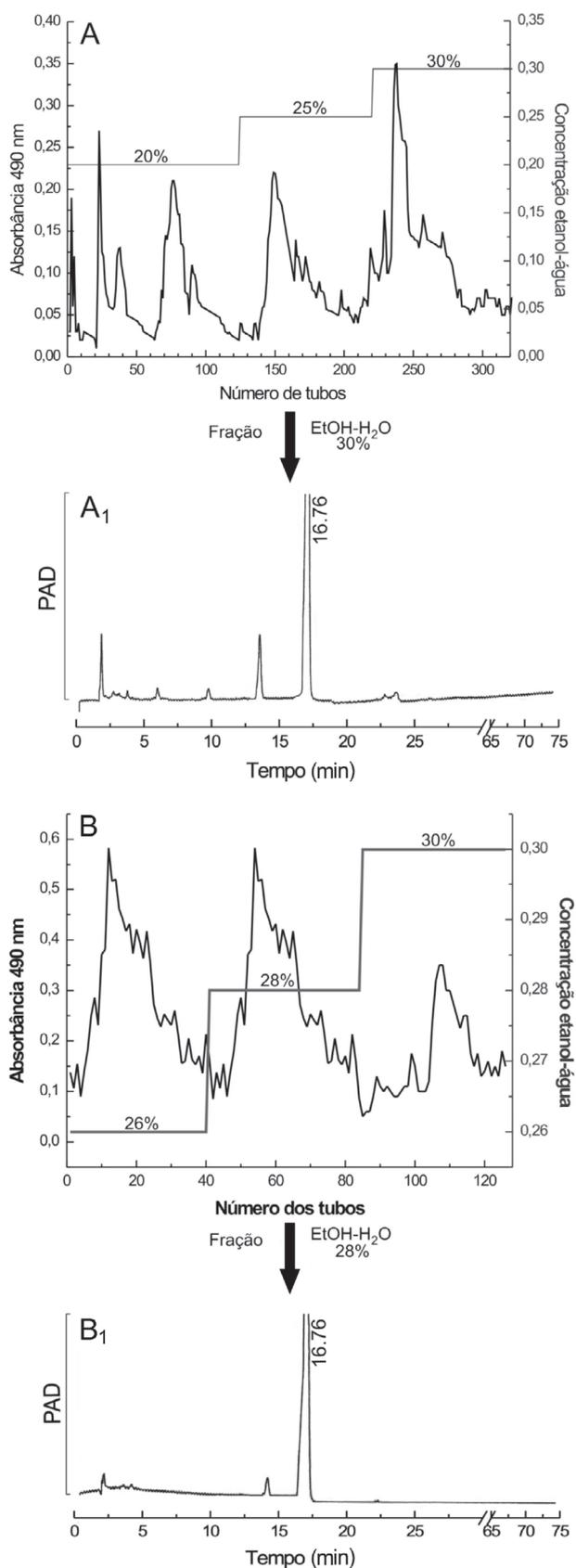


Figura 3. Cromatografia em carvão-Celite (A) do primeiro pico proveniente da cromatografia de gel permeação, com respectiva análise por HPAEC/PAD (fração eluída a 30% - A₁). Cromatografia em carvão-Celite (B) da fração EtOH-H₂O 30% e respectiva análise por HPAEC/PAD (fração eluída a 28% - B₁)

Análises espectroscópicas de RMN ¹H e RMN ¹³C foram realizadas para caracterização química do componente.

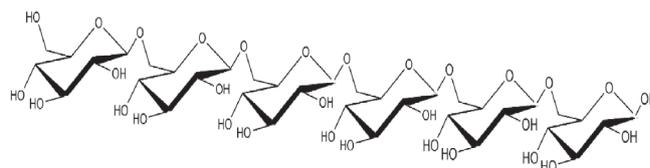
Comparando-se os espectros de RMN ¹³C do componente em estudo com dados da literatura,^{22,29} os deslocamentos químicos foram caracterizados como sendo de uma molécula constituída por unidades glucopiranosídicas 1→6 substituídas. A ausência de sinais na região entre 77,0 e 90,0 ppm é uma forte evidência de uma molécula 6-O-substituída.

O espectro de correlação heteronuclear ¹H-¹³C HMQC (Figura 1S-A, material suplementar) apresenta um sinal em δ_H 4,42 e δ_C 103,47 atribuído à posição anomérica das unidades β -D-glucopiranosídicas não redutoras; observa-se também um sinal de menor intensidade em δ_H 4,56 e δ_C 96,18, correspondente à extremidade redutora da molécula na forma β .²⁹ O espectro de correlação homonuclear ¹H-¹H COSY (Figura 1S-B) mostra um acoplamento do próton em δ_H 4,42 (H-1) com o próton em δ_H 3,23, o que indica que este último corresponde a H-2. A análise da correlação do COSY permite atribuir os sinais correspondentes aos demais hidrogênios (δ_{H-3} : 3,39; δ_{H-4} : 3,38; δ_{H-5} : 3,53; δ_{H-6a} : 3,77 e δ_{H-6b} : 4,13). A análise conjunta dos espectros de HMQC (Figura 1S-A) e COSY (Figura 1S-B) permitiu fazer a atribuição de todos os ¹H e ¹³C da molécula. A correspondência entre os espectros permite atribuir os sinais em δ_C 73,43; 75,23; 69,69 e 75,18, respectivamente, aos carbonos 2, 3, 4 e 5 das unidades glucosídicas. O sinal de ¹³C em 69,06 ppm, correlacionado aos sinais de ¹H em 3,77 e 4,13 ppm, refere-se ao C-6 O-substituído. O componente C-6, com OH livre da extremidade terminal não redutora, aparece em 61,02 ppm e está relacionado aos ¹H em 3,63 e 3,80 ppm.

O espectro de massa do oligossacarídeo no modo negativo (Figura 2S-A) mostrou um *cluster* de sinais centrados em *m/z* 991,7 (M-H)⁻, que foi atribuído a um oligossacarídeo com seis unidades glucopiranosídicas. Esses picos correspondem aos diversos níveis de troca isotópica devido à dissolução da amostra em D₂O. O espectro de massas no modo positivo (Figura 2S-B) apresentou dois *cluster* de sinais de *m/z* 1015,7 e 1031,7, os quais foram atribuídos à cationização com sódio (M+Na)⁺ e potássio (M+K)⁺, respectivamente. O espectro de fragmentação (Figura 2S-C) mostrando perdas sucessivas de unidades de glucose (162 uma) é consistente com a massa molecular do oligossacarídeo contendo seis unidades glucosídicas.

CONCLUSÕES

A partir das análises efetuadas neste trabalho, pode-se concluir que o oligossacarídeo obtido por hidrólise ácida parcial do botriosferana e purificado pelos métodos cromatográficos descritos, trata-se de uma molécula constituída, exclusivamente, por unidades glucopiranosídicas β (1→6), cuja estrutura encontra-se representada abaixo.



Estrutura 1.

Estudos posteriores sobre o potencial biológico deste hexaoligosaccharídeo poderão ser realizados, considerando-se o aumento do grau de solubilidade dessa molécula quando comparado ao do polímero original, botriosferana.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As figuras relativas às análises de ressonância de carbono e próton (1S-A e 1S-B) e espectrometria de massa (2S-A, 2S-B e 2S-C) do oligossacarídeo purificado encontram-se no material suplementar disponível gratuitamente em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo pdf, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (processo nº 02/13888-5), CNPq e Fundação Araucária (Projeto nº 5777).

REFERÊNCIAS

1. Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 81.
2. Barbosa, A. M.; Steluti, R. M.; Dekker, R. F. H.; Cardoso, M. S.; Corradi da Silva, M. L.; *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1691.
3. Steluti, R. M.; Giese, E. C.; Pigatto, M. M.; Sumiya, A. F. G.; Covizzi, L. G.; Job, A. E.; Cardoso, M. S.; Corradi da Silva, M. L.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M.; *J. Basic Microbiol.* **2004**, *44*, 480.
4. Corradi da Silva, M. L.; Izeli, N. L.; Martinez, P. F.; Silva, I. R.; Constantino, C. J. L.; Cardoso, M. S.; Barbosa, A. M.; Dekker, R. F. H.; da Silva, G. V. J.; *Carbohydr. Polym.* **2005**, *61*, 10.
5. Wasser, S. P.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 258.
6. Paulsen, B. S.; *Phytochem. Rev.* **2002**, *1*, 379.
7. Corradi da Silva, M. L.; Martinez, P. F.; Izeli, N. L.; Silva, I. R.; Vasconcelos, A. F. D.; Cardoso, M. S.; Steluti, R. M.; Giese, E. C.; Barbosa, A. M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 85.
8. Miranda, C. C. B. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2006.
9. Klarzynski, O.; Plesse, B.; Joubert, J.-M.; Yvin, J.-C.; Koop, M.; Kloareg, B.; Fritig, B.; *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 1027.
10. Giese, E. C.; Covizzi, L. G.; Borsato, D.; Dekker, R. F. H.; Corradi da Silva, M. L.; Barbosa, A. M.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 3783.
11. Giese, E. C.; Covizzi, L. G.; Dekker, R. F. H.; Monteiro, N. K.; Corradi da Silva, M. L.; Barbosa, A. M.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1265.
12. Johansson, L.; Virkki, L.; Anttila, H.; Esselström, H.; Tuomainen, P.; Sontag-Strohm, T.; *Food Chem.* **2006**, *97*, 71.
13. Bland, E. J.; Keshavarz, T.; Bucke, C.; *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1673.
14. Hirayama, M.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 1271.
15. Vogel, H. J.; *Genet. Bull.* **1956**, *13*, 42.
16. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Reber, P. A.; Smith, F.; *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350.
17. Nelson, N. A.; *J. Biol. Chem.* **1944**, *153*, 376.
18. Somogyi, M. A.; *J. Biol. Chem.* **1945**, *160*, 61.
19. Bao, X.-F.; Zhen, Y.; Ruan, L.; Fang, J.-N.; *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 623.
20. Gutierrez, A.; Prieto, A.; Martinez, A. T.; *Carbohydr. Res.* **1996**, *281*, 143.
21. Whistler, R. L.; BeMiller, J. N.; *Meth. Carbohydr. Chem.* **1962**, *1*, 47.
22. Corradi da Silva, M. L.; Iacomini, M.; Jablonski, E.; Gorin, P. A.; *Phytochemistry* **1993**, *35*, 547.
23. Oliveira, P. F.; Doná, F.; Marcelli, M.; Cardoso, M. S.; Corradi da Silva, M. L.; *Eclética Quím.* **2002**, *27*, 211.
24. Rice, K. G.; Corradi da Silva, M. L.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *720*, 235.
25. Elifio, S. L.; Corradi da Silva, M. L.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; *New Phytol.* **2000**, *145*, 327.
26. Schmid, F.; Stone, B. A.; McDougall, B. M.; Bacic, A.; Martin, K. L.; Brownlee, R. T. C.; Chai, E.; Seviour, R. J.; *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 163.
27. Bao, X.-F.; Fang, J.; Li, X.-Y.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65*, 2384.
28. Lowe, E.; Rice, P.; Há, T.; Li, C.; Kelley, J.; Ensley, H.; Lopez-Perez, J.; Kalbfleisch, J.; Lowman, D.; Margl, P.; Browder, W.; Williams, D. A.; *Microbes and Infection* **2001**, *3*, 789.
29. Agrawal, P. K.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307.