

# Caracterización de mezclas de oligogalacturónidos bioactivos

**Yuliem Mederos-Torres, Josefa Hormaza-Montenegro,\* Ines Reynaldo-Escobar y Raquel Montesino-Sequi.\*\***

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Carretera Tapaste San José kilómetro 3½, San José de las Lajas, Mayabeque, Código Postal: 32 800, Cuba. yuliem@inca.edu.cu \*Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras Carretera al Central Manuel Martínez Prieto km 2 1/2, Ciudad de La Habana, Cuba. \*\* Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Avenida 31 y 158, Playa, La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de septiembre de 2010.

Aceptado: 10 de agosto de 2011.

Palabras clave: oligogalacturónidos, pectina, ácidos urónicos, 2-aminobenzamida.  
Key words: oligogalacturonide, pectin, uronic acid, 2-aminobenzamide.

**RESUMEN.** Los oligogalacturónidos son oligosacáridos pécticos compuestos por cadenas lineales de ácido D-galacturónico, unidos por enlaces glicosídicos del tipo  $\alpha$  (1-4). Las mezclas de oligogalacturónidos se obtienen por hidrólisis enzimática de pectinas de fuentes vegetales diversas. Estos oligosacáridos desencadenan una actividad biológica diversa en las plantas, la cual depende fundamentalmente de sus grados de polimerización. El Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas cuenta con una tecnología patentada a escala nacional que permite obtener una mezcla de oligogalacturónidos con grados de polimerización diferentes. En este trabajo, se presenta la caracterización por análisis espectrofotométrico de mezclas de oligogalacturónidos atendiendo al contenido de ácidos urónicos, azúcares reductores y azúcares neutros, obtenidas a partir de dos ácidos pécticos de origen cítrico. Asimismo, se obtiene el perfil cromatográfico de las muestras en estudio, mediante la derivatización con la 2-aminobenzamida y la separación por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. Se logra la separación de al menos, ocho oligómeros de ácido galacturónico, que presentan un grado de polimerización variable. Por su parte, el análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) mostró que las mezclas estaban compuestas por sales de los ácidos urónicos. Los resultados mostraron que a partir de dos ácidos pécticos con características diferentes, se pueden obtener mezclas de oligogalacturónidos de similar composición química, pero que difieren en la proporción en la que éstos se presenten.

**ABSTRACT.** Oligogalacturonides are pectic oligosaccharides composed of lineal chains of D-galacturonic acid, linked by  $\alpha$  (1-4) glycosidic linkage. Oligogalacturonides' mixtures are obtained by enzymatic hydrolysis of pectins of diverse vegetal species. These oligosaccharides unchain a diverse biological activity in plants, which depends mainly on their polymerization degrees. The National Institute of Agricultural Science has a patent technology at national scale that lets to obtain a mixture of oligogalacturonides with different polymerization degree. In this work is presented the characterization of oligogalacturonides by spectrophotometric analysis attending to their uronic acids, reductor sugars, and neutral sugars content. Also the chromatographic profile of samples in study is obtained, using the derivatization with 2-aminobenzamide label and the separation by high pH anion exchange chromatography. It is achieved the separation of at least eight galacturonic acid oligomers with a variable degree of polymerization. On the other hand, the analysis by Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) showed that mixtures were composed by galacturonic acid salts. Results indicated that starting from two pectic acids with different characteristics, mixtures of oligogalacturonides of similar chemical composition could be obtained, but they differ in the proportion that they are presented.

## INTRODUCCIÓN

Las pectinas constituyen un importante componente de la pared celular de las plantas dicotiledoneas.<sup>1</sup> Se localizan en la pared celular primaria y en la lamela media de prácticamente todos los tejidos de las plantas superiores.<sup>2</sup> Están compuestas por tres regiones distintas: el homogalacturano (HGA), constituido por un esqueleto lineal de ácido D-galacturónico unido por un enlace glicosídico del tipo  $\alpha$  (1-4) que puede estar metilesterificado en el carbono 6,<sup>3</sup> el ramnogalacturano I (RG-I) compuesto por una secuencia alternada de unidades de ácido D-galacturónico y ramnosa, con cadenas

laterales de galactosa y arabinosa enlazadas al residuo de la ramnosa y, por último, el ramnogalacturano II (RG-II) formado por un esqueleto de HGA con cuatro cadenas laterales complejas.<sup>4</sup>

Se conoce como ácido péctico al ácido D-poligalacturónico esencialmente libre de grupos metoxilos y que puede ser preparado por desesterificación ácida, básica o enzimática de la pectina.<sup>5</sup> A su vez, los oligogalacturónidos (Ogal) pueden obtenerse a partir de la hidrólisis ácida o enzimática del ácido péctico y han sido estudiados tanto por la respuesta biológica que desencadenan en las plantas en dependencia de su grado de

polimerización, como por la posibilidad de permitir la elucidación de la estructura de la pectina, mediante el estudio de la obtención, separación y cuantificación de los Ogal metilesterificados.<sup>6</sup>

Los Ogal pueden ser separados y cuantificados por cromatografía de intercambio aniónico combinada con la detección de dispersión de la luz por evaporación, más conocida como ELSA mediante los cuales se obtienen excelentes resultados y se logra la identificación y separación de al menos, 70 residuos de oligosacáridos.<sup>7</sup> Por otro lado, el empleo de la detección por fluorescencia, con la siguiente derivatización de los Ogal con 2-aminobenzamida es una técnica sumamente sensible que permite detectar Ogal a nivel de picomoles.<sup>8</sup>

El objetivo del trabajo fue caracterizar y comparar dos mezclas de Ogal, obtenidas por hidrólisis enzimática de ácido péctico. En este sentido, se realizó el análisis del contenido de ácidos urónicos, de azúcares neutros y reductores presentes en ellas. Se realizó la derivatización de las mezclas con 2-aminobenzamida y una vez derivatizadas, se separaron por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Las mezclas de Ogal fueron obtenidas por degradación enzimática de dos ácidos pécticos, de ellos uno comercial (OgalAPC), con masa molecular promedio en número (Mn) de 4 700 y el otro obtenido por desesterificación de pectina cítrica Sigma (OgalAPlab) con Mn de 9 600, de acuerdo con la metodología establecida por Cabrera y cols.<sup>5</sup>

Las mezclas de Ogal fueron caracterizadas mediante la espectrofotometría UV-VIS. Para ello, se empleó el método desarrollado por Filisetti y Carpita,<sup>9</sup> el cual utiliza como cromóforo el m-hidroxidifenilo en la determinación de ácidos urónicos. El contenido de azúcares reductores, a su vez, fue determinado por el método de Nelson,<sup>10</sup> el cual se basa en la oxidación de un azúcar reductor con el empleo de una disolución cúprico alcalina. En una primera etapa, el azúcar se oxida y reduce el cobre II a cobre I, y, posteriormente, el cobre I se oxida a cobre II con el empleo de un complejo incoloro de arsenomolibdato, aportando el color azul característico en el proceso de reducción. En ambas técnicas, se empleó como patrón el ácido galacturónico (AGal). Por otro lado, la determinación del contenido de azúcares neutros se realizó mediante el método desarrollado por Helbert y Brawn,<sup>11</sup> el cual se basa en la hidrólisis total de los azúcares neutros enlazados a la cadena de ácidos urónicos, en medio ácido, con el empleo de ácido sulfúrico concentrado. Los extremos reductores liberados mediante esta técnica reaccionan con el reactivo antrona en condiciones ácidas, para dar un compuesto coloreado verde azul al reaccionar con las hexosas. En este último método, se empleó como patrón D-glucosa.

El grado de polimerización (gp) promedio en los Ogal fue estimado por el poder reductor del oligosacárido, relacionando la concentración de ácidos urónicos presentes

en una disolución de oligosacáridos y su concentración en azúcares reductores (extremo terminal reductor).<sup>5</sup>

La derivatización se realizó con 2-aminobenzamida (2AB) según la metodología descrita por Ishii y cols.<sup>12</sup> Se resuspendieron 10 µg de mezcla de Ogal y de AGal en 5 µL de la disolución de marcaje 2AB [disolución de 2AB (2 mol/L) y de NaCNBH<sub>3</sub> en DMSO : HAc], a 65 °C durante 2 h. El exceso de reactivo se eliminó mediante la aplicación de los Ogal y el Agal derivatizados sobre un papel Watman. Se empleó acetoniitrilo como fase móvil. La separación se llevó a cabo durante 1,5 h, en una campana de extracción y fue seguida con la ayuda de una lámpara UV. Los Ogal y el AGal derivatizados fueron resuspendidos en agua y secados en una concentradora al vacío a 60 °C.

La separación de las mezclas se realizó por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. Las mezclas de Ogal y el patrón derivatizados fueron resuspendidos en agua a una concentración de 0,1 mg/mL. La disolución de las muestras, de 10 µL de volumen, fueron aplicadas sobre una columna BioSep-DEAE-PEI (75 mm X 7,80 mm), Phenomenex (USA) equilibrada con formiato de amonio 0,5 mol/L a pH 9. Se empleó un detector de fluorescencia L-7485 Lachrom Merck Hitachi, cuyas longitudes de onda de excitación y emisión fueron 330 y 420 nm, respectivamente. Los oligosacáridos fueron eluidos con un gradiente lineal de formiato de amonio 0,5 mol/L a pH 9 (A) y metanol 10 % (B). Para la determinación de los tiempos de retención (tr) de los Ogal, se empleó como patrón el Agal marcado previamente con 2AB cuyo tr fue de 27,05 min.

Los espectros IR se obtuvieron en un espectrómetro FTIR modelo Vector 22 (Bruker Optik) en el intervalo de 4 000 a 500 cm<sup>-1</sup>, en unidades de absorbancia con aditamento de ATR. El procesamiento de los espectros se realizó mediante el programa OPUS NT.

Los resultados se interpretaron por análisis de varianza de clasificación simple, en caso de diferencias significativas, las medias se compararon según la prueba de menores diferencias significativas de Fisher (p < 0,05).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización química de las mezclas OgalAPC y OgalAPlab (Tabla 1) mostró que el contenido de ácidos urónicos determinado en ellas fue de 71 y 74 %, respectivamente. Estos valores fueron ligeramente inferiores a los reportados por Thibault y cols,<sup>13</sup> al realizar estudios sobre la composición química de pectinas cítricas demetoxiladas, encontraron que el contenido de ácidos urónicos en ellas era del 83 %. De acuerdo con Matsuura y cols,<sup>14</sup> el bajo contenido de ácidos urónicos presente en los hidrolizados pécticos puede estar dado por la degradación de las pectinas en el proceso de obtención a consecuencia de la autólisis.

A su vez, el análisis del contenido de azúcares neutros (8 y el 7 %, respectivamente) mostró la no existencia de diferencias significativas entre las mezclas OgalAPC

**Tabla 1.** Caracterización de las mezclas de oligogalacturónidos

| Muestras  | Ácidos urónicos |     | Azúcares neutros |     | Azúcares reductores |     | gp |
|-----------|-----------------|-----|------------------|-----|---------------------|-----|----|
|           | (mg/g ± ES)     | (%) | (mg/g ± ES)      | (%) | (mg/g ± ES)         | (%) |    |
| OgalAPC   | 705 ± 10        | 71  | 76 ± 2           | 8   | 60 ± 0*             | 6   | 12 |
| OgalAPlab | 744 ± 10        | 74  | 73 ± 2           | 7   | 80 ± 0*             | 8   | 9  |
|           |                 | NS  |                  | NS  |                     |     |    |

NS No significativo. ES Error estándar. \* Expresa diferencias significativas para p < 0,05.  
gp Grado de polimerización.

y OgalAPlab. Estos resultados fueron ligeramente superiores a los encontrados por Thibault y cols,<sup>13</sup> cuyo trabajo indicó que el contenido de azúcares neutros en las pectinas cítricas era del 5 %, compuestas mayoritariamente por ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa en trazas. Sin embargo, esta diferencia puede deberse a la no corrección de la respuesta de los ácidos urónicos en la determinación de los azúcares neutros, ya que estos representan el 5 % de la respuesta de las hexosas.<sup>15</sup>

Por otra parte, la determinación del contenido de azúcares reductores (6 y el 8 % para OgalAPC y OgalAPlab, respectivamente) mostró diferencias significativas. Lo que unido a los resultados encontrados en la determinación de ácidos urónicos y azúcares neutros, parece indicar que existen diferencias en cuanto a la composición de los oligómeros presentes en ambas mezclas.

La determinación del gp promedio de las mezclas OgalAPC y OgalAPlab atendiendo a su carácter reductor indicó que se encontraba entre el 12 y el 9, respectivamente. Estos resultados confirmaron la diferencia en la composición de oligómeros en ambas mezclas, donde la mezcla OgalAPC presenta oligómeros con un gp promedio superior al encontrado en la mezcla OgalAPlab. De acuerdo con Cabrera y cols,<sup>16</sup> los Ogal que presentan un gp entre 10 y 14 manifiestan una mayor actividad biológica en las plantas, la cual está condicionada por la especie a la que pertenezcan y por la concentración a la

cual son aplicados.<sup>4</sup> Sin embargo, otros autores plantean que los Ogal con un grado de polimerización inferior a este intervalo también presentan actividad biológica; tal es el caso de Aziz y cols,<sup>17</sup> cuyo trabajo indica que los Ogal con gp comprendido entre 7 y 10 levantan una fuerte respuesta defensiva, con la expresión de la fenilalanina amonioliasa (PAL) y la estilbenosintasa (STS) en vid (*Vitis vinífera*). Por lo tanto, de acuerdo con el gp promedio determinado en las mezclas en estudio, se pudo decir que ambas estaban compuestas por Ogal bioactivos.

El empleo de la derivatización de los azúcares reductores presentes en los Ogal con la 2-aminobenzamida y su posterior separación por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, permitió establecer el perfil cromatográfico de las mezclas OgalAPC y OgalAPlab (Fig. 1). La separación de los Ogal derivatizados terminó a los 48 min de iniciada la corrida cromatográfica para ambas mezclas. El tr del patrón AGal derivatizado (27,05 min) permitió inferir que las primeras señales transcurridos los primeros 24 min de la corrida en ambas mezclas, se corresponden con la elución de los azúcares neutros y las impurezas presentes en ellas.

Un análisis de ambos cromatogramas permitió apreciar una similitud en el tr del primer compuesto asociado a la elución de los azúcares neutros alrededor de los primeros 7 min (Fig. 1). Sin embargo, es válido aclarar

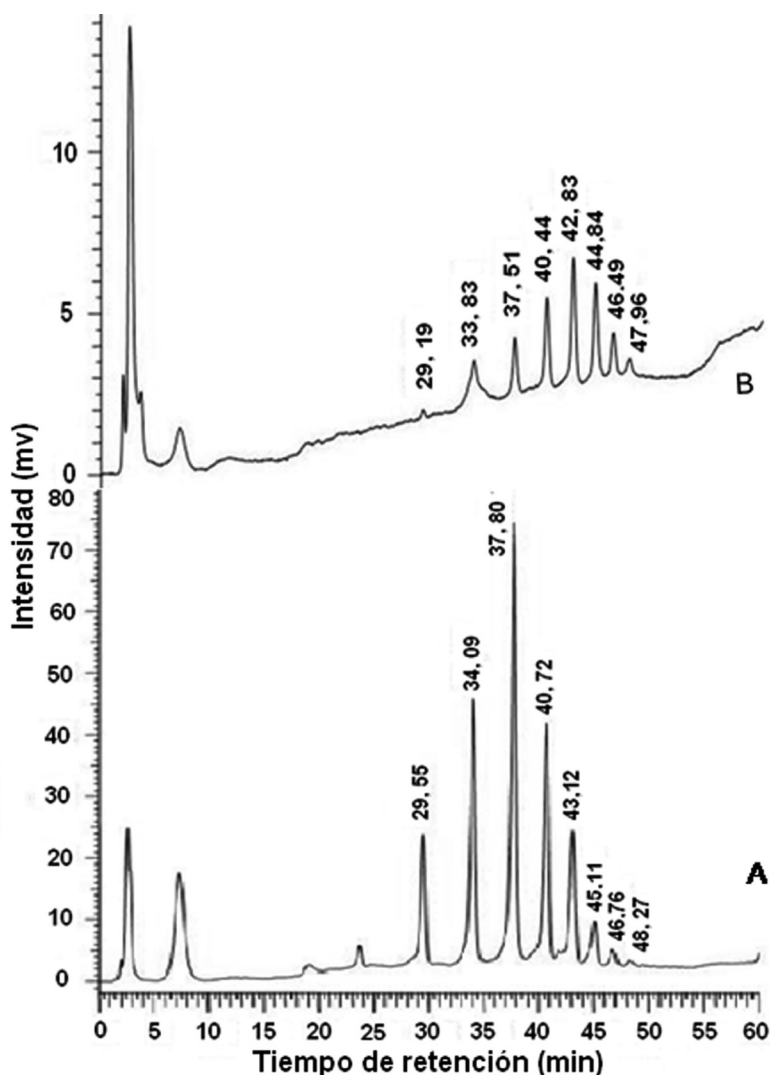


Fig. 1. Cromatogramas de las mezclas de oligogalacturonidos OgalAPC (A) y OgalAPlab (B) derivatizados.

que la técnica de derivatización con la 2-aminobenzamida solo derivatiza los azúcares reductores presentes en las mezclas, por lo que queda un porcentaje de azúcares neutros sin derivatizar, los cuales no pueden ser detectados mediante esta técnica. De manera general, la elución temprana de los azúcares neutros está dada por su débil enlace con la columna, ya que la carga neta de sus moléculas respectivas es cero.<sup>2</sup>

El análisis de la separación de los Ogal en cada mezcla fue realizado de acuerdo con el tiempo de retención relativo de ellos respecto al AGal (Tabla 2). Los resultados mostraron una similitud en la composición de los Ogal presentes en ambas mezclas. De esta forma, fueron detectados ocho compuestos en las dos mezclas OgalAPC y OgalAPLab.

El análisis de las cantidades relativas de los compuestos eluidos (Tabla 2) mostró diferencias en la proporción

**Tabla 2.** Tiempos de retención relativos al ácido galacturónico de las mezclas de Ogal, derivatizadas con 2-AB y separados por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución

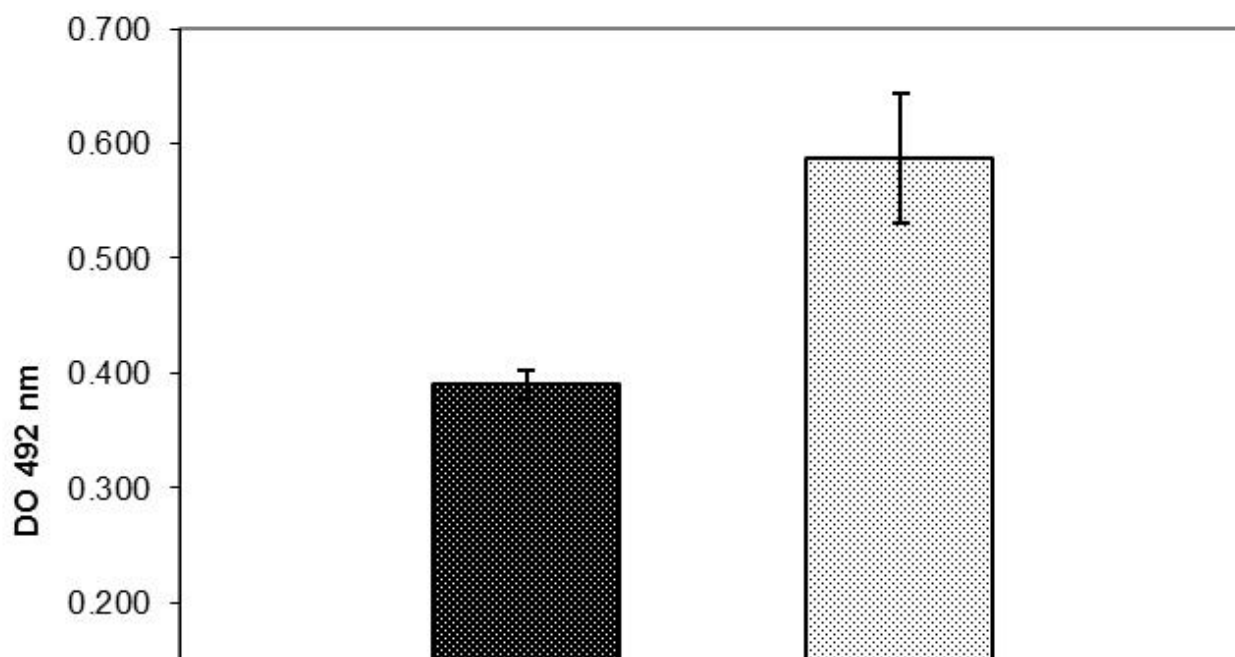
|   | OgalAPLab      |                       | OgalAPC        |                       |
|---|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
|   | TRR (unidades) | Cantidad relativa (%) | TRR (unidades) | Cantidad relativa (%) |
| 1 | 1,00           | 5                     | 1,02           | 9                     |
| 2 | 1,18           | 11                    | 1,19           | 20                    |
| 3 | 1,31           | 11                    | 1,32           | 34                    |
| 4 | 1,42           | 17                    | 1,43           | 19                    |
| 5 | 1,51           | 26                    | 1,52           | 10                    |
| 6 | 1,58           | 21                    | 1,59           | 4                     |
| 7 | 1,64           | 9                     | 1,66           | 2                     |
| 8 | 1,70           | 2                     | 1,71           | 1                     |

TRR tiempo de retención relativo al AGal.

en la que estos se encuentran en cada una de las mezclas. De esta forma, las cantidades relativas de los compuestos 1, 2 y 3 en la mezcla OgalAPC fueron superiores a los determinados en la mezcla OgalAPLab, mientras que en el compuesto 4 fue similar en ambas mezclas. Por otra parte, la mezcla OgalAPLab mostró cantidades relativas de los compuestos 5, 6 y 7 superiores a las encontradas en la mezcla OgalAPC. Las diferencias encontradas en la proporción en la que los Ogal se presentan en ambas mezclas pueden estar dadas por la masa molecular del polisacárido de partida, unido a la acción que la enzima realiza sobre este, teniendo en cuenta que las condiciones de hidrólisis asumidas fueron iguales en ambos casos. Este planteamiento concuerda con los estudios realizados por Cameron *et al* 2008,<sup>18</sup> sobre el modo de acción de una endopoligalacturonasa purificada de *Aspergillus aculeatus*, sobre pectinas cítricas previamente demetoxiladas, el cual varía en dependencia de la longitud del fragmento hidrolizado. De esta forma, se encontró que a medida que disminuye la longitud de los fragmentos hidrolizados, se incrementa significativamente la producción de oligómeros con  $gp < 9$ , mientras que al hidrolizar fragmentos de mayor tamaño se incrementa la proporción de los oligómeros con  $gp$  entre 7 y 18.

El análisis por espectrometría FTIR permitió caracterizar las muestras atendiendo a la composición de sus grupos funcionales (Tabla 3). El espectro de absorción del AGal (Fig. 2) componente principal de las mezclas de Ogal, mostró bandas de absorción a 1 705 y 1 647  $cm^{-1}$ , características de los grupos carboxilos, así como las vibraciones del C-H a 2 955-2 836  $cm^{-1}$ , del C-O a 1 093  $cm^{-1}$ , características de los alcoholes secundarios, las asimétricas del C-O-C a 1 154  $cm^{-1}$ , las  $\delta_{C-H}$  del anillo a 939  $cm^{-1}$  y las del enlace intermolecular del grupo O-H a 3 313  $cm^{-1}$ .<sup>19</sup>

Al establecer una comparación entre los espectros de absorción de las mezclas OgalAPC, OgalAPLab y el ácido galacturónico (Tabla 3) se evidenció una similitud en cuanto a las vibraciones de valencia de los enlaces



**Fig. 2.** Espectros IR de las mezclas de oligogalacturónidos OgalAPC (■) y OgalAPLab (▨) y AGal (⋯).

**Tabla 3.** Frecuencias características de las muestras OgalAPC, OgalAPlab, AGal.

| Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )   | OgalAPC | OgalAPlab | AGal                |
|----------------------------------|---------|-----------|---------------------|
| $\nu_{OH}$                       | 3 297   | 3 277     | 3 313               |
| $\nu_{CH}$                       |         |           | 2 955, 2 919, 2 836 |
| $\nu_{as\ COO^-}$                | 1 592   | 1 594     | -                   |
| $\nu_{as\ COOH}$                 | -       | -         | 1 705, 1 647        |
| $\delta_{OH, CCH, COH}$          | 1 409   | 1 412     | 1 412, 1 326        |
| $\nu_{s\ COO^-}$                 | 1 329   | 1 326     | 1 326               |
| $\nu_{as\ C-O-C}$                | 1 141   | 1 142     | 1 154               |
| $\nu_{C-O\ alcohol\ secundario}$ | 1 094   | 1 095     | 1 093               |

$\nu_{C-H}$ ,  $\nu_{as\ C-O-C}$ ,  $\nu_{C-O}$ ,  $\delta_{C-H}$  y  $\nu_{OH}$ . Sin embargo, en las bandas de absorción de las mezclas OgalAPC y OgalAPlab, no se observaron las bandas características de los grupos carboxílicos presentes en el AGal y sí un corrimiento isocrómico hacia 1 592 y 1 594 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, lo cual no se corresponde con las bandas de absorción de los ácidos carboxílicos y sí con las de los carboxilatos.

Cuando una sal proviene de un ácido carboxílico, es de esperar que las bandas de los grupos C=O y C-O sean sustituidas por dos bandas carbono-oxígeno, las cuales presentan una constante de fuerza intermedia entre el C=O y C-O, con un fuerte acoplamiento entre estos dos osciladores "banda y media", lo que resulta en una fuerte vibración de *stretching* CO<sub>2</sub> simétrico a 1 450-1 360 cm<sup>-1</sup>.<sup>20</sup> Estos resultados indicaron que, en el proceso de obtención de las mezclas de Ogal según el procedimiento empleado, se obtuvieron sales de ácidos carboxílicos. La formación de dichas sales pudo estar dada por la utilización de hidróxido de sodio en el ajuste del pH, durante el proceso de obtención de estas mezclas, lo que explica por tanto, la posible formación de oligopectatos de sodio.

## CONCLUSIONES

De forma general, se puede concluir que el gp de las mezclas OgalAPC y OgalAPlab estudiadas es variable, atendiendo a su carácter reductor y apoyado por la separación cromatográfica. También se confirma la presencia de azúcares neutros en ambas mezclas. El empleo de la derivatización de las mezclas con 2-aminobenzamida y su posterior separación por cromatografía de intercambio aniónico revela que ambas mezclas presentan un perfil cromatográfico similar, compuesto por al menos ocho oligómeros que pueden presentar actividad biológica, siendo evidente la diferencia en la proporción en la que estos se encuentran en ellas. A su vez, el análisis por espectrometría FTIR corroboró que las mezclas están compuestas por sales de los ácidos galacturónicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- O'Donoghue E, Somerfield S. Biochemical and rheological properties of gelling pectic isolates from buttercup squash fruit. *Food Hydrocolloids*. 2008;22:1326-1336.
- Yapo B, Robert C, Etienne I, Wathelet B, Paquot M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry* 2007;100:1356-1364.
- Morris G, Garcia J, Ortega A, Castile J, Smith A, Harding E. Molecular flexibility of citrus pectins by combined sedimentation and viscosity analysis. *Food Hydrocolloids*. 2008; 22:1435-1442.
- Inngjerdingen M, Inngjerdingen K, Patel T, Allen S, Chen X, Rolstad B, *et al.*, Pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells. *Glycobiology*. 2008;18 (12):1074-1084.

- Cabrera JC, Iglesias R, Hormaza JH, Gomez R, Diosdado E, Gutierrez AE, *et al.*, inventores. Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial No 2003-155.
- Kim Y, Kim YS, Yoo S, Kim K. Molecular differences of low methoxy pectins induced by pectin methyl esterase I: Effects on texture, release and perception of aroma in gel systems. *Food Chemistry*. 2010;123:451-455.
- Cameron RG, Grohmann K. Separation, detection and quantification of Galacturonic Acid Oligomers with a degree of polymerization greater than 50. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2005;28:559-570.
- Maury D, Couderc F, Czaplicki J, Garrigues J, Poinot V. Optimized conditions for 2-aminobenzamide labeling and high-performance liquid chromatography analysis of N-acetylated monosaccharides. 2010;24(4):343-346.
- Filiberti TM, Carpita NC. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*. 1991;197:157-162.
- Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 1946;153:375-380.
- Helbert J, Brawn K. Colours reactions of hexuronic acids with anthrone. *Analytical Chemistry*. 1956;28(7):1098-1100.
- Ishii T, Ichita J, Matsue H, Ono H, Maeda I. Fluorescent labeling of pectic oligosaccharides with 2-aminobenzamide and enzyme assay for pectin. *Carbohydrate Research*. 2002;337:1023-1032.
- Thibault J, Renard C, Axelos M, Roger P, Crépeau M. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*. 1993; 238:271-286.
- Matsuura Y, Matsubara K, Fuchigami M. Molecular composition of onion pectic acid. *Food Chemistry and Toxicology*. 2000;65(7):1160-63.
- Luzio G. Determination of galacturonic acid content of pectin using a microtiter plate assay. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 2004;117:416-421.
- Cabrera J, Boland A, Messiaen J, Cambier P, Cutsem P. Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology*. 2008;18(6):473-482.
- Aziz A, Gauthier A, Bézier A, Poinssot B, Joubert JM, Pugin A, Heyraud A, Baillieux. Elicitor and resistance-inducing activities of  $\beta$ -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with  $\beta$ -1,3 glucans and  $\alpha$ -1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*. 2007; 58(6):1463-72.
- Cameron R, Luzio G, Goodner K, Williams M. Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methyl esterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydrate Polymers*. 2008;71:287-299.
- Cartaya O, Reynaldo I, Peniche J. Adsorción de iones cobre por una mezcla de oligogalacturónidos para su empleo en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2009;40(2):95-99.
- Norman B, Lawrence H, And Stephen E. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy. *Carbonylic Compounds*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Academic Press: 1975:278-311.