



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**CAMILA BARBOSA PINHEIRO**

**ISOLAMENTO DE PLASTÍDIOS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES EM  
DESENVOLVIMENTO DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.).**

**Fortaleza - CE  
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**CAMILA BARBOSA PINHEIRO**

**ISOLAMENTO DE PLASTÍDIOS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES EM  
DESENVOLVIMENTO DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.).**

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade. Orientador: Prof. Francisco de A. P. Campos

---

Camila Barbosa Pinheiro

**Fortaleza - CE  
2010**

**CAMILA BARBOSA PINHEIRO**

**ISOLAMENTO DE PLASTÍDIOS PRESENTES EM ENDOSPERMA DE  
SEMENTES EM DESENVOLVIMENTO DE PINHÃO MANSO (*Jatropha  
curcas* L.).**

Aprovada em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Francisco A. P. Campos  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Gilberto Barbosa Domont  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Osmundo Brilhante de Oliveira Neto  
Embrapa - CENARGEN

Com amor, dedico aos ***Meus Pais.***

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** agradeço pela benção diária e pelo dom da vida.

Ao **Professor Francisco de Assis de Paiva Campos**, a quem devo grande parte da minha formação acadêmica. Agradeço por ser um orientador presente, um cientista admirável e por ter me possibilitado trabalhar em um projeto que me deu bastante satisfação. Professor, obrigada pelas oportunidades.

À **Professora Arlete Aparecida Soares**, um exemplo de profissional dedicada e competente. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório. A sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao **Professor Gilberto Barbosa Domont**, a quem admiro não somente por ser um profissional exemplar, mas também por ser uma pessoa tão agradável e carismática. Obrigada pela disponibilidade de contribuição para o trabalho e pela oportunidade de estágio no seu laboratório. Foi uma honra tê-lo como membro da minha banca examinadora.

Ao **Dr. Osmundo Brilhante**, a quem tenho profundo respeito e estima, gostaria de agradecer imensamente pelo aceite em fazer parte da minha banca examinadora. Obrigada pelas críticas, sugestões e pela contribuição para a obtenção de um trabalho de melhor qualidade.

Ao **Fábio Cesar Nogueira**, sua colaboração foi essencial. Espero um dia alcançar sua disciplina e dedicação profissional.

Ao **Thiago Lustosa Jucá**, além da amizade, agradeço pelas inúmeras dúvidas esclarecidas sobre proteômica, por ter me ensinado a trabalhar com química de proteínas e por me ajudar em experimentos relacionados. Muito obrigada!

Ao **Jefferson Soares Oliveira** por sempre demonstrar presteza. Obrigada principalmente pela ajuda nas análises dos géis bidimensionais pelo ImageMaster.

Ao **Professor Hamilton Ferreira Gomes de Abreu**, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Ceará pela gentileza em conceder prontamente a utilização do microscópio de varredura.

Ao **Luis Flávio Gaspar Herculano**, engenheiro responsável pelo Laboratório de Caracterização de Materiais da Universidade Federal do Ceará pela disponibilidade de auxílio, de forma tão prestativa e bem humorada, na utilização do MEV.

À **Celli Rodrigues Muniz**, responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Embrapa Agroindústria Tropical, por ter possibilitado a realização de parte dos experimentos de microscopia eletrônica de varredura neste laboratório.

Ao **Daniel Cordeiro da Costa**, por ter ajudado de forma tão agradável durante os experimentos de microscopia eletrônica de varredura.

Ao **Professor João Bosco Pitombeira**, por gentilmente ter permitido a utilização da plantação de pinhão manso do Departamento da Fitotecnia.

Ao **Dr. Francisco Jose Lima Aragão**, por ter facilitado o meu acesso ao laboratório de Microscopia eletrônica do CENARGEN. Agradeço a presteza e a hospitalidade em seu laboratório (Laboratório de Transferência de Genes – CENARGEN). Também agradeço pelas considerações feitas a respeito dos resultados obtidos.

Aos integrantes do Laboratório de Transferência de Genes do CENARGEN, por terem me recepcionado de forma tão acolhedora e prestativa, de forma especial, agradeço à **Cristiane Citadine e à Aisy Baldoni**.

Ao **Dr. Guy de Capdeville**, pela oportunidade de estágio no laboratório de Microscopia Eletrônica do CENARGEN. Também agradeço pela disponibilidade em fazer sugestões relacionadas aos resultados obtidos na microscopia eletrônica.

À **Ana Cristina Gomes (Aninha)** e à **Aisy Botega Baldoni** por terem me ajudado de forma tão agradável e prestativa durante os experimentos de microscopia eletrônica e por terem sido fundamentais para o bom êxito do trabalho. Conviver com vocês foi um prazer.

À **Dra. Sônia Nair Bão** do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica por ter permitido a utilização do microscópio eletrônico de transmissão desta instituição.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas **Muciana, Thiago, Raquel, Emanuela, Nicholas, Gabriela, Ícaro, Daniel, Bruno e André**, pelos momentos de descontração, desabafos e pelo bom convívio.

À **Muciana** e à **Emanuela**, pela ajuda na correção da dissertação.

À **Raquel** e ao **Daniel**, pela companhia nas idas e vindas durante as marcações das flores na plantação.

Ao **Ícaro** pela companhia e participação em diversos momentos no decorrer dos experimentos.

Ao **Bruno** e ao **André** pela gentileza de terem levado minhas amostras para análise por espectrometria de massa ao Rio de Janeiro.

Às meninas do laboratório de Botânica da Universidade Federal do Ceará, **Ileane, Débora, Manuela, Carol e Marília**, por proporcionar um ambiente de trabalho leve e harmonioso.

Às amigas de graduação e mestrado **Danielle, Jacilane e Raquel**, pela amizade cumplicidade, união e por saber que posso sempre contar com vocês!

A todos os integrantes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Aos meus pais **Maria Edvani Barbosa Pinheiro** e **Francisco das Chagas Almeida Pinheiro** pelo apoio, dedicação e amor incondicional, vocês são o meu melhor presente enviado por Deus e os responsáveis por todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos **Bruno** e **Milena Barbosa Pinheiro** pela nossa verdadeira relação de união e amor.

Ao **Emmanuel** meu melhor amigo, meu companheiro, meu cúmplice e meu amor. Obrigada por caminhar ao meu lado e fazer os meus dias mais bonitos!

Aos meus tios, em especial à **tia Liduina**, por ser uma tia tão presente e preocupada com a minha realização pessoal e profissional. Você é a tia!

Às queridas amigas de longas datas **Camila**, **Areti** e **Rejane**, por estar sempre na torcida pelo meu sucesso e por fazer parte da minha vida.

- Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

- **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Banco do Nordeste (BNB), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Petróleo Brasileiro (PETROBRAS)**, das quais recebeu auxílio financeiro.

- **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará**, em cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada. **Laboratório de Química de Proteínas – Unidade de Proteômica do Instituto de Química (UFRJ)**; ao **Laboratório de Microscopia Eletrônica da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)**, da **Embrapa - Agroindústria Tropical** e do **Instituto de Biologia / Departamento Biologia Celular (UNB)**, e ao **Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM)- Departamento de Engenharia Mecânica e de Produção (UFC)**, onde parte desta pesquisa foi realizada.

## RESUMO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), pertencente à família Euphorbiaceae, é uma planta oleaginosa com grande potencial para a produção de biocombustível devido à riqueza de lipídios em suas sementes. Ele também apresenta toxicidade devido à presença de ésteres de forbol. Nesse contexto, o objetivo deste estudo é realizar o isolamento de plastídios, local de síntese de ácidos graxos e de ésteres de forbol, presentes no endosperma de sementes em desenvolvimento de *J. curcas*. Experimentos preliminares através de análises morfológica, histológica e histoquímica foram realizados para determinação do estágio do desenvolvimento da semente mais adequado para o isolamento de plastídios presentes no endosperma. Estas análises revelaram que a deposição de lipídios e proteínas no endosperma se inicia por volta do 30° DAA. O isolamento de plastídios, do endosperma de sementes nesse estágio foi realizado por centrifugação em gradiente descontínuo de PBF-Percoll (10%, 22%, 35%). A fração enriquecida de plastídios foi obtida a partir da banda formada na interface da camada de 22-35%. Análises por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão foram realizadas para confirmar a eficiência do protocolo empregado na purificação dos plastídios. Mapas bidimensionais foram estabelecidos, os “spots” detectados nos mesmos serão identificados por espectrometria de massa, o que possibilitará a identificação das proteínas plastidiais envolvidas na síntese dos ácidos graxos e dos ésteres de forbol no endosperma de sementes de *J. curcas*.



## ABSTRACT

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) belongs to Euphorbiaceae family, is an oleaginous plant with high potential for biofuel production due to the high amount of lipids in their seeds. This plant is toxic due to the presence of phorbol esters. In this context, the objective of this study is the isolation of plastids, site of synthesis of fatty acids and phorbol esters, present in the endosperm of developing seeds of *J. curcas*. Preliminary experiments using morphological, histology and histochemistry analysis were performed to determine the most appropriate stage for the isolation of plastids present in the developing endosperm seeds of *J. curcas*. These tests revealed that the lipid and protein deposition in the endosperm starts around the 30th DAA. The isolation of plastids, from endosperm at this stage was performed by discontinuous gradient centrifugation of PBF-Percoll (10%, 22% and 35%). The purified fraction of plastids was obtained from the band formed in the interface layer of 22-35%. Analyses by scanning and transmission electron microscopy were carried out to confirm the efficiency of the protocol used in the purification of plastids. Two-dimensional maps were established; spots detected will be identified by mass spectrometry, which allows the identification and better understanding of protein plastids involved in the synthesis of fatty acids and phorbol esters.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
SUMÁRIO.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
ABREVIATURAS.....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 O Pinhão manso.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Lipídios.....</b>	<b>20</b>
1.2.1. Armazenamento de lipídios na semente.....	20
1.2.2. Composição de ácidos graxos na produção de óleo.....	21
<b>1.3. Toxicidade de semente.....</b>	<b>26</b>
1.3.1. Curcina.....	26
1.3.2. Ésteres de forbol.....	27
<b>1.4. Importância dos plastídios no estudo de sementes de pinhão manso.....</b>	<b>31</b>
1.4.1. Plastídios.....	31
1.4.2. Proteômica de plastídios.....	32
<b>1.5 Principais métodos utilizados para isolamento de organelas.....</b>	<b>33</b>
1.5.1. Métodos utilizados para o isolamento de leucoplastos.....	34
<b>1.6. Caracterização morfológica de sementes de pinhão manso.....</b>	<b>36</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>

<b>3.1 Caracterização Morfológica, histológica e histoquímica.....</b>	<b>38</b>
3.1.1. Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento da semente de pinhão manso.....	38
3.1.2. Determinação da massa fresca e massa seca de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	38
3.1.3. Análises histológicas de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	38
3.1.4. Análises histoquímicas de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	40
3.1.5. Análise de sementes em desenvolvimento de pinhão manso por microscopia eletrônica de transmissão – MET.....	41
<b>3.2. Isolamento de plastídios de endosperma de sementes de pinhão manso.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3. Processamento das frações I, II e III para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</b>	<b>44</b>
<b>3.4. Processamento das frações I, II, III para análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....</b>	<b>44</b>
<b>3.5. Estabelecimento de mapas bidimensionais da fração enriquecida de organelas (fração II) e da fração enriquecida de plastídios (fração III).....</b>	<b>45</b>
3.5.1. Extração de proteínas totais com tampão piridina.....	45
3.5.2. Dosagem de proteínas.....	45
3.5.3 Eletroforese bidimensional, revelação e análise da imagem.....	45
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Caracterização morfológica, anatômica e histoquímica de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....</b>	<b>47</b>
4.1.1. Dimensões de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	47
4.1.2. Determinação das curvas de massa fresca e massa seca de sementes de em desenvolvimento de pinhão manso.....	47
4.1.3. Caracterização morfológica de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	50

4.1.4 Análises histológicas da deposição de reservas durante o desenvolvimento de sementes de pinhão manso.....	56
4.1.5. Análise histoquímica da deposição de lipídios e proteínas em sementes em desenvolvimento pinhão manso.....	64
4.1.6. Análise por Microscopia de transmissão (MET) de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	68
<b>4.2. Isolamento de plastídio do endosperma de sementes de pinhão manso (<i>J. curcas</i>).....</b>	<b>76</b>
4.2.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	76
4.2.2 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	78
<b>4.3. Estabelecimento de mapas bidimensionais.....</b>	<b>80</b>
4.3.1. Fração rica em organelas (Fração II).....	80
4.3.2. Fração rica em plastídios (Fração III).....	85
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>91</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Aspectos morfológicos gerais do pinhão manso.	18
2. Estrutura do tetradecanoil forbol-13-acetato	28
3. Estrutura do 12-deoxi-16-hidroxiforbol presente no óleo de semente de pinhão manso	30
4. Desenvolvimento de sementes de pinhão manso ( <i>J. curcas</i> )	39
5. Esquema do processo utilizado para o isolamento plastidial	43
6. Gráfico de dimensões da semente de pinhão manso em desenvolvimento	48
7. Curvas de massa fresca e massa seca de sementes de pinhão manso em desenvolvimento.	49
8. Caracterização morfológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento, aos 5, 10, 15 e 20 DAA.	51
9. Caracterização morfológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento, aos 25, 30 e 35 DAA.	53
10. Caracterização morfológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento, aos 40, 45 e 50 DAA.	55
11. Análise histológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento aos 5 e 10 DAA .	57
12. Análise histológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento aos 15 e 20 DAA.	59
13. Análise histológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento aos 25 DAA e 30 DAA.	61
14. Análise histológica de células do endosperma de sementes de pinhão manso com 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA.	63
15. Análise histoquímica com Sudan IV, específica para lipídios, de células	65

do endosperma de sementes de pinhão manso com 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA	
16. Análise histoquímica com Xylidine Ponceau, específica para proteínas, de células do endosperma de sementes de pinhão manso com 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA.	67
17. Imagens por MET de células do endosperma de sementes de pinhão manso com 25, 30, 35 e 45 DAA	69
18. Fração enriquecida em plastídios obtida através centrifugação de uma fração enriquecida em organelas em um gradiente descontínuo de PBF-Percoll.	77
19. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) das frações I, II e III.	79
20. Mapas bidimensionais da fração enriquecida de organelas	82
21. Mapas bidimensionais da fração enriquecida de organelas	84
22. Mapas bidimensionais da fração enriquecida de plastídios	86
23. Mapa bidimensional de referência da fração enriquecida de plastídios	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
1. Composição de ácidos graxos (%) nas principais oleaginosas comerciais	23
2. Composição de ácidos graxos (%) em pinhão manso	25
3. “Spots” mais abundantes detectados no gel de referência obtido da fração enriquecida de plastídios utilizando tira de IPG com pH na faixa de 4 a 7	89

## ABREVIATURAS

RIPs	-----	Proteínas inativadoras de ribossomos
TAP	-----	4 $\beta$ -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
PCK	-----	Proteína quinase C
2D	-----	Eletroforese bidimensional
IEF	-----	Focagem isoelétrica
DAA	-----	Dias após antese
MET	-----	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	-----	Microscopia Eletrônica de Varredura
T. H.	-----	Tampão de homogeneização
BSA	-----	Albumina sérica bovina
PBF Percoll	----	PEG 4000, BSA, Ficoll em percoll (ver anexo 1)
PVPP	-----	Polivinilpolipirrolidona
SDS	-----	Sodium doldecyl sulfate
DTT	-----	Ditiotreitol
IAA	-----	Iodoacetamida
IPG	-----	Gradiente de pH imobilizado
pI	-----	Ponto isoelétrico
SDS-PAGE	----	SDS-Poliacrilamida gel eletroforese
PSA	-----	Persulfato de amônio
TCA	-----	Ácido tricloroacético
TFA	-----	Ácido trifluoroacético



## 1. INTRODUÇÃO

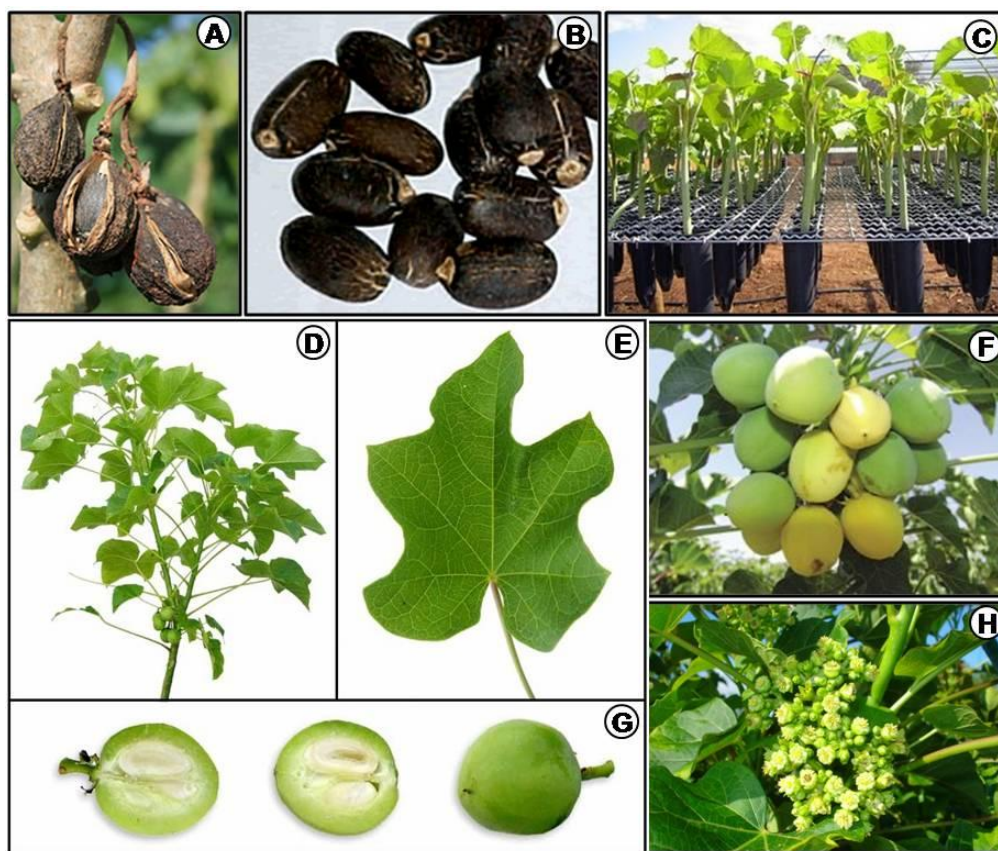
### 1.1. O Pinhão manso

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) pertence à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonideae e gênero *Jatropha*, o qual inclui cerca de 175 espécies, dentre as quais ocorre uma variação significativa quanto à resposta às pragas, perfil de ácidos graxos, padrão de inflorescência e infrutescência (LAKSHMINARAYANA e SUJATHA, 2001).

Segundo Openshaw (2000), o pinhão manso, é uma planta nativa da América, mas atualmente também é encontrada em países da África e Ásia. Ele pode ser cultivado em áreas de solos pouco férteis e de clima desfavorável à maioria das culturas alimentares tradicionais, como por exemplo, no semi-árido nordestino, pois essa espécie é bastante resistente à seca. (FRANCIS, 2005). Por ser perene, também contribui para a conservação do solo e reduz o custo de produção, fator importante para sua viabilidade econômica, especialmente na agricultura familiar.

O pinhão manso é uma planta de porte médio, o que facilita a colheita das sementes. Entretanto, em condições ideais, poder atingir mais de 3 metros de altura (MELO *et. al.* 2006). Seus frutos são cápsulas que contêm em seu interior as sementes. As sementes são escuras quando maduras, dentro das quais se encontra uma amêndoa branca. As sementes secas medem de 1,5 a 2 cm de comprimento, variando de acordo com as condições de cultivo, e apresentam considerável conteúdo de óleo (MELO *et. al.*, 2006). A Figura 1 mostra aspectos morfológicos gerais do pinhão manso.

Algumas variedades de pinhão manso foram obtidas através de seleções feitas em populações naturais. A variedade de Cabo Verde tem se dispersado por todo o mundo, a de Nicarágua produz poucos frutos, entretanto eles são largos resultando em uma produtividade equivalente às outras variedades (HENNING, 2006). No México existe uma variedade que parece ser menos tóxica que as demais, pois apresenta menores níveis de ésteres de forbol (MAKKAR e BECKER, 1997)



FONTE: [www.es.gov.br](http://www.es.gov.br).

Figura 1: Aspectos morfológicos gerais do pinhão manso. A. fruto maduro; B. semente madura; C. mudas; D. parte aérea; E. folha; F. frutos em desenvolvimento; G. parte interna do fruto em desenvolvimento; H. inflorescência.

Em várias partes do mundo representantes do gênero *Jatropha* vêm sendo utilizados para a recuperação de áreas em processo de desertificação e de terras improdutivas, já que as folhas ao cair durante os meses do inverno, se acumulam no solo em torno da zona da raiz das plantas, melhorando a fertilidade do solo (KUMAR e SHARMA, 2008).

O pinhão manso pode apresentar utilidade em diversos aspectos. A torta (resíduos da extração do óleo) da semente pode ser utilizada como fonte de nutrientes para plantas, já que são ricas em nitrogênio (KUMAR e SHARMA, 2008). Segundo Heller (1996) e Kaushik e Kumar (2004), diferentes partes da planta podem ser usadas na medicina popular: as sementes podem ser utilizadas no tratamento de artrite; o tronco, no tratamento de inflamação e sangramento gengival; o extrato vegetal no tratamento de alergias, queimaduras e cicatrização. Ainda relacionado com propriedades medicinais, compostos como a curcaciolina A, com atividade antitumoral foi encontrada nessa planta (VAN DEN BERG *et. al.*, 1995). Substâncias como os ésteres de forbol, que são tóxicos para os humanos, foram isoladas e apresentaram propriedade moluscicida, inseticida e fungicida (SOLSOLOY e SOLSOLOY, 1997)

Além dessas propriedades, o pinhão manso é uma oleaginosa que pode ser utilizada para a produção de biodiesel. Melo *et. al.* (2006), realizaram estudos do potencial do uso do pinhão manso para a produção do biodiesel e mostraram que as propriedades fluidodinâmicas do biodiesel de pinhão manso, massa específica e viscosidade, atendem às especificações da Portaria ANP nº310/2001 (Petrodiesel- óleo diesel mineral); o ponto de fulgor, parâmetro importante para a segurança durante o manuseio do combustível, apresentou valor dentro das especificações da Portaria ANP nº 42/2004 (B100-biodiesel puro).

Estudos sobre fontes renováveis de energia vêm se intensificando nos últimos anos com o objetivo de se obter alternativas que minimizem problemas como a escassez e a alta no preço do petróleo, e que proporcionem menor agressão ambiental. Dentre essas fontes o biodiesel pode ser importante também para reduzir a importação de óleo diesel, podendo ser promissor para o desenvolvimento econômico.

Por se tratar de uma oleaginosa, com potencial para produção de biodiesel, considerações sobre a importância dos lipídios se tornam necessário.

## 1.2. Lipídios

Os lipídios apresentam importantes funções biológicas para as plantas. Gorduras e óleos são formas importantes de armazenamento de carbono reduzido em muitas sementes e são compostos capazes de produzir grande quantidade de energia. (SLABAS e FAWCETT, 1992).

Além dos lipídios de reserva, são também importantes os fosfolipídios polares, constituintes essenciais do sistema de membranas celulares e de organelas. A organização das membranas afeta diretamente a normalidade dos processos fisiológicos em sementes, como a germinação, a dormência, a manifestação do vigor, a tolerância à dessecação e o condicionamento fisiológico (NERY, 2006).

Outros lipídios como as ceras, que constituem a cutícula reduzem a perda de água de tecidos expostos e dificultam a invasão de patógenos, proporcionando proteção à planta; os terpenóides (isoprenóides) incluem os carotenóides que estão envolvidos na fotossíntese e os esteróis os quais estão presentes em muitas membranas vegetais, também desempenham função de destaque nos vegetais (BUCHANAN *et. al*, 2000).

Além de desempenhar papéis biológicos importantes, o óleo produzido por uma variedade de oleaginosas, como a soja, o babaçu, o girassol, a canola, o amendoim, a mamona e o pinhão manso, vem despertando interesse econômico para a sociedade, na medida em que o mesmo vem sendo vinculado à produção de biodiesel (SUBRAMANIAN *et. al.*, 2005).

Em se tratando do semi - árido do Nordeste brasileiro a produção de biodiesel a partir do óleo de mamona vem recebendo grande destaque. Contudo, outras oleaginosas adaptadas ao clima desfavorável dessa região, como a oiticica e o pinhão manso, objeto de estudo desse trabalho, merecem estudos mais aprofundados.

Em sementes de pinhão manso, o embrião fica embebido no endosperma, o qual, segundo Yang (2009), constitui mais de 90% do peso total da semente, e 60% do endosperma é constituído de óleo, o qual pode ser consumido gradualmente durante os estágios iniciais do desenvolvimento da plântula.

### 1.2.1. Armazenamento de lipídios nas sementes

Os lipídios geralmente são estocados na forma de triacilgliceróis, três ácidos graxos esterificados ao glicerol. Eles fornecem energia e armazenamento de carbono, sendo a

principal forma de lipídios presente nas sementes, fruto e grãos de pólen. (BUCHANAN *et. al.*, 2000). Essa forma de lipídio fica armazenada dentro de estruturas denominadas de corpos lipídicos ou oleossomos. A estrutura da membrana dos oleossomos, formada apenas por uma camada de fosfolipídios, resulta do padrão de biossíntese dos triacilgliceróis, a qual é completada por enzimas localizadas na membrana do retículo endoplasmático. A bicamada da membrana do retículo endoplasmático se intumescce e se separa à medida que mais triacilgliceróis são adicionados à estrutura em crescimento. Por fim um corpo lipídico maduro desprende-se do retículo endoplasmático (MURPHY, 2001).

O oleossomo é estabilizado por proteínas específicas com peso molecular de 15-24 kDa, denominadas de oleosinas. Estas estão presentes na membrana fosfolipídica de camada única, evitam a fusão entre membranas de oleossomos adjacentes e previne a coalescência dessa organela durante a dessecação da semente (SILOTO *et. al.*, 2006)

Os copos lipídicos podem ser encontrados em diversos tecidos da semente como nos cotilédones e eixo embrionário, no escutelo ou na camada de aleurona. Nas sementes de mamona, como também de pinhão manso, os oleossomos se acumulam principalmente nas células do endosperma (HUANG, 1992).

### **1.2.2. Composição de ácidos graxos na produção de óleo**

A síntese de ácidos graxos nos vegetais ocorre nos plastídios. São nessas organelas onde ocorre a maioria das atividades biossintéticas. Os leucoplastos de sementes oleaginosas em desenvolvimento não são fotossintéticos, eles, portanto, têm que importar moléculas do citosol para gerar precursores para biossíntese dos ácidos graxos, sendo o ATP, NADH, NADPH e o acetil – CoA seus precursores diretos. Nos leucoplastos de endosperma de mamona o substrato mais utilizado na biossíntese de ácidos graxos é o malato, pois seus leucoplastos contêm a enzima málica dependente de NADP, que pode funcionar tanto no fornecimento de carbono como de NADPH para a biossíntese dos ácidos graxos. Essa enzima por conferir à mamona a capacidade de gerar piruvato e NADPH dentro do leucoplasto, pode estar envolvida com a capacidade excepcional de síntese e estocagem de lipídios no endosperma de suas sementes (SHEARER *et. al.*, 2004).

A composição de ácidos graxos do óleo determina as suas propriedades e sua utilidade. A maioria das plantas produz apenas um pequeno número de ácidos graxos com 16 ou 18 carbonos de comprimento, com zero a três duplas ligações em posições específicas. Estes são muitas vezes referidos como os ácidos graxos "comuns" e eles são os ácidos graxos predominantes de óleos vegetais comerciais (Tabela 1), como da soja

(*Glycine max* L., Fabaceae), dendê (*Elaeis guineensis*., Arecaceae), de canola (*Brassica napus* L., Brassicaceae) e girassol (*Helianthus annuus* L., Asteraceae) (SMITH, 2007). Dentro do reino vegetal, no entanto, um conjunto diversificado de ácidos graxos "incomuns" é sintetizado, muitos dos quais seriam matérias-primas industriais valiosas se disponíveis em quantidades suficientes. Esses ácidos graxos diferem dos ácidos graxos comuns em aspectos como o comprimento da cadeia, grau de insaturação e posição de dupla ligação, ou pela presença de funções químicas, tais como hidroxila, grupos acetilênicos e halogênicos (BADAMI e PATIL, 1981). Embora estes ácidos graxos possam estar presentes em níveis elevados em óleos de sementes, eles são geralmente encontrados somente em um pequeno número de espécies de plantas, a maioria das quais não tem características agrônômicas adequadas à produção comercial, sendo a mamona uma exceção, pois produz ácido ricinoléico, ácido graxo incomum, em altos níveis e apresenta características que possibilitam sua aplicação comercial, sendo matéria prima para a produção de biodiesel e lubrificante.

Desde o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, um esforço considerável tem sido dirigido para identificação dos genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos.

Técnicas como RNA de interferência (WANG e WATERHOUSE, 2002) podem ser aplicadas para silenciar genes específicos em uma planta. A aplicação dessa técnica pode ser utilizada para melhorar características específicas, tais como a composição dos ácidos graxos, ou para reduzir o teor de componentes indesejáveis das sementes, como a ricina em mamona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae) (SMITH, 2007).

A presença de níveis relativamente baixos (10% a 15%) de ácido ricinoléico (12-hidroxi ácido oléico), em um óleo vegetal rico em ácido oléico, por exemplo, proporcionou uma melhora significativa na característica do óleo em aplicações de lubrificantes (GRUSHCOW e SMITH, 2006). Já foi demonstrado que esses níveis podem ser alcançados pela transformação de sementes oleaginosas com o gene oleato-12 hidroxilase da mamona (BROUN *et. al.*, 1998; SMITH *et. al.*, 2003; GRUSHCOW e SMITH, 2006).

Tabela 1: Composição de ácidos graxos (%) nas principais oleaginosas comerciais (SMITH, 2007).

<b>Ácido graxo</b>	<b>Soja</b>	<b>Palma (mesocarpo)</b>	<b>Palma (amendoa)</b>	<b>Canola</b>	<b>Girassol</b>
<b>Laurico (12:0)</b>			45		
<b>Mirístico(14:0)</b>			18		
<b>Palmitico (16:0)</b>	9	48	9	4	7
<b>Esteárico (18:0)</b>	4	4	3	2	5
<b>Oléico (18:1)</b>	24	36	15	60	19
<b>Linoléico (18:2)</b>	54	10	8	20	68
<b>Linolênico (18:3)</b>	8			11	1

Um progresso considerável ocorreu nos últimos anos para aumentar a homogeneidade dos ácidos graxos que naturalmente existem nas principais culturas. Um bom exemplo é o aumento do conteúdo de ácido oléico (18:1) alcançado através do melhoramento genético de canola (*Brassica napus*), soja (*Glycine Max*), girassol (*Helianthus annuus*, Asteraceae), cártamo (*Carthamus tinctorius* L., Asteraceae) e amendoim (*Arachis hypogaea* L., Fabaceae) gerando cultivares contendo esse ácido graxo na faixa de 80% a 90% (DREXLER *et. al.*, 2003). Níveis semelhantes foram obtidos na canola, soja e algodão por engenharia genética (KINNEY, 1996; STOUTJESDIJK *et. al.*, 2000; LIU *et. al.*, 2002).

A composição dos principais ácidos graxos do óleo de pinhão manso está apresentada na Tabela 2. O seu óleo atende aos requisitos necessários para produção de combustível. Ele contém mais de 75% de ácidos graxos insaturados. A composição de ácidos graxos do óleo de *J. curcas* apresenta um predomínio de ácido oléico (C18: 1) seguido de ácido linoléico (C18: 2). Além do genótipo, a composição de ácidos graxos do óleo é influenciada pelo estágio de maturação dos frutos no momento da coleta (ACHTENA *et. al.*, 2008).

A composição de ácidos graxos pode ser alterada, até certo ponto, através de hibridação. No entanto, uma abordagem mais específica seria a de silenciar os genes delta-9 ou delta-12 desaturase para o acúmulo dos ácidos esteárico e oléico, respectivamente, como vem sendo feito em outras culturas oleaginosas (LIU *et. al.*, 2002), e dessa forma, passar a ser uma melhor fonte de matéria – prima para produção de biodiesel.

A partir do exposto acima, tem-se que a composição dos ácidos graxos do óleo é fundamental para determinar suas propriedades. Técnica de silenciamento gênico pode ser aplicada para a obtenção de óleo de melhor qualidade, voltado para produção de biodiesel. Essa técnica pode ser bastante útil no contexto do óleo de sementes de pinhão manso, o qual, apesar de apresentar propriedades adequadas para a produção de biodiesel, pode passar a ter um rendimento produtivo de óleo ainda melhor.



Tabela 2: Composição de ácidos graxos (%) em pinhão manso (ACHTENA *et. al.*, 2008).

<b>Ácido graxo</b>	<b>Pinhão manso</b>
<b>Palmitico (16:0)</b>	<b>14,54</b>
<b>Esteárico (18:0)</b>	<b>6,3</b>
<b>Oléico (18:1)</b>	<b>42,02</b>
<b>Linoléico (18:2)</b>	<b>35,38</b>

### 1.3. Toxicidade da semente

Apesar de o pinhão manso poder ser utilizado para diversos fins, ele possui compostos tóxicos: curcina e ésteres de forbol. Tais compostos serão descritos a seguir.

#### 1.3.1. Curcina

Muitas plantas contêm proteínas que são capazes de inativar ribossomos, as quais apresentam atividade N-glicosídica sendo estas denominadas de proteínas inativadoras de ribossomo (RIPs). As RIPs são divididas em três classes: tipo I, tipo II e tipo III (LUO, *et. al.*, 2007).

As RIPs do tipo I consistem de um polipeptídico de cadeia única com peso molecular variando de 24 a 30 KDa e ponto isoelétrico em pH alcalino. As proteínas “pokeweed” antiviral (PAP), trisantina (TCS) e curcina, presentes em *Phytolacca americana*, *Trichosanthes kirilowii* e *Jatropha curcas*, respectivamente, são exemplos de RIP do tipo I (HUANG *et. al.*, 2008).

As RIPs do tipo II apresentam duas cadeias ligadas entre si: uma cadeia A, similar a cadeia da RIP do tipo I, a qual possui a atividade catalítica N-glicosídica, e uma cadeia B, uma lectina, galactose específica, com atividade de se ligar a carboidrato, a qual reconhece e se liga à receptores específicos da membrana celular, possibilitando sua entrada na célula e levando à morte celular. A RIP do tipo II melhor estudada é a ricina, presente em *Ricinus communis*. A abrina, viscumina, ebulina e nigrina, são também representantes desse tipo de RIP, apresentando mesma estrutura e função que a ricina (XU e LIU, 2004).

As RIPs do tipo III são consideradas uma peculiaridade da RIP do tipo I, sendo encontrada, no milho, a b-32; e na cevada, JIP60 (HUANG, *et. al.*, 2008). Ela é um peptídeo de cadeia única, consistindo de um domínio N-terminal semelhante ao da RIP do tipo I, ligado a um domínio C-terminal com função desconhecida (HAO, *et. al.*, 2001).

Devido à curcina ser uma RIP do tipo I, ela possui a atividade catalítica, mas não é capaz de se ligar à célula. Dessa forma, ela não é um composto que confere alta propriedade tóxica ao pinhão manso. Na verdade o principal composto que confere toxicidade às sementes e aos óleos das sementes dessa espécie são os ésteres de forbol, os quais apresentam propriedades extremamente tóxicas para a maioria dos vertebrados (JING *et. al.*, 2005)

### 1.3.2. Ésteres de forbol

Ésteres de forbol são diterpenóides tetracíclicos no qual dois grupos hidroxila de átomos de carbono vizinhos estão esterificados a ácidos graxos. Assim como os demais diterpenos, eles são produzidos nos plastídios (BUCHANAN, 2000),

A estrutura dos ésteres de forbol é dependente do esqueleto de carbono diterpeno tetracíclico conhecido como tigliane, ele é a porção alcoólica fundamental nos ésteres de forbol. Tigliane contém quatro anéis: A, B, C e D. A hidroxilação de sua estrutura básica em diferentes posições, seguida de ligação de ésteres a várias moléculas ácidas resultam na formação de uma larga variedade de compostos de ésteres de forbol, no 4 $\beta$ -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TAP), éster de forbol, por exemplo, o qual foi observado primeiramente em plantas do gênero *Croton* (GOEL *et. al.*, 2007) (Figura 2). Duas categorias de forbol,  $\alpha$  e  $\beta$ , que diferem no seu grupo hidroxila no anel C, distinguem a forma ativa da inativa. A localização do grupo hidroxila dita a forma ativa ( $\beta$ ) ou inativa ( $\alpha$ ), que resulta em arranjo espacial do anel D. A forma inativa dos ésteres de forbol apresenta propriedades lipofílica e físico-química similares às da forma ativa ( $\beta$ ), entretanto elas não são capazes de ativar a PKC devido às mudanças conformacionais (SILINSKY e SEARL, 2003).

Os ésteres de forbol e seus derivados podem induzir uma grande diversidade de efeitos biológicos em concentrações consideravelmente baixas. Sendo responsáveis por, por exemplo, por efeitos irritantes na pele e pela promoção de tumores.

Os efeitos biológicos promovidos pelos ésteres de forbol ocorrem devido à interação dos ésteres de forbol com a proteína quinase C (PKC), afetando a atividade de várias enzimas, biossíntese de proteínas, DNA, poliaminas, processos de diferenciação celular e expressão gênica (GOEL *et. al.*, 2007). Eles estimulam a PKC, que está envolvida na transdução sinal e nos processos de desenvolvimento da maioria das células e tecidos, produzindo uma variedade de efeitos biológicos, em uma ampla gama de organismos (GOEL *et. al.*, 2007).

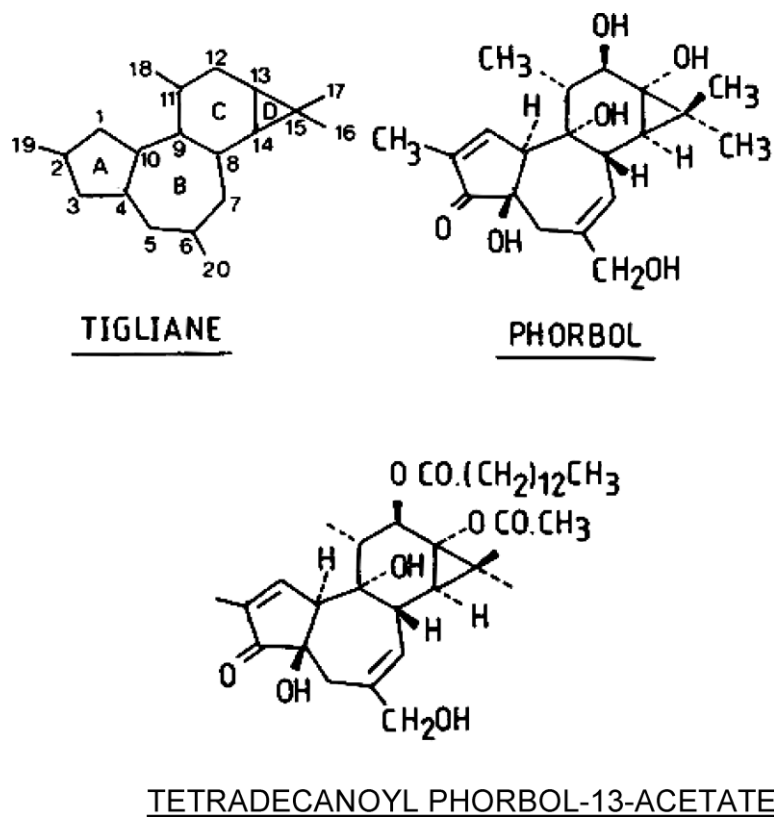


Figura 2: Estrutura do tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) (Evans 1986).

Os ésteres de forbol apresentam atividades pró-carcinogênica e ação inflamatória. A resposta inflamatória se dá devido aos ésteres de forbol mobilizarem fosfolipídios, liberando ácido araquidônico e causando a secreção de prostaglandinas. Já a atividade promotora de tumor, parece estar relacionada com a capacidade apresentada pelos ésteres de forbol de substituir o diacilglicerol, o ativador natural da proteína quinase C, (a qual está relacionada com a ativação de diversas vias metabólicas), devido à sua similaridade estrutural com o mesmo; e também às suas habilidades de estimular a síntese de proteínas, síntese de RNA e DNA, comportando-se como agentes mitogênicos (OLIVEIRA *et. al.*, 2002).

Os ésteres de forbol estão presentes no pinhão manso. Diversos estudos mostram seus efeito biológicos. Adolf *et. al.* (1984) verificaram o efeito irritante na pele ocasionado por ésteres de forbol presentes em óleos de sementes de pinhão manso; Hirota *et. al.* (1988) verificaram que esse composto, extraído da planta, induz a formação de tumor; Wink *et. al.* (1997) observaram a atividade inseticida de ésteres de forbol presentes em sementes de pinhão manso.

Jing *et. al.* (2005), obtiveram, a partir de sementes de pinhão manso, um tipo de éster de forbol, denominado de Jatropherol I. Esse composto apresentou efeitos tóxicos em *Bombyx mori*, em que alterações na atividade de enzimas intestinais foram verificadas. Essas alterações ocorrem devido ao Jatropherol - I atuar no retículo endoplasmático, dilatando, levando à formação de vesículas, e diminuindo a atividade ribossômica das células epiteliais do intestino, prejudicando, portanto a síntese protéica. Outro éster de forbol identificado no pinhão manso é o forbol-12-miristato 13-acetato. Segundo Makkar e Becker (1997), este é o principal composto tóxico em *Jatropha*. O 12-deoxi-16-hidroxforbol (Figura 3) é outro exemplo de éster de forbol obtido a partir do óleo de pinhão manso (HAAS, *et. al.*, 2002).

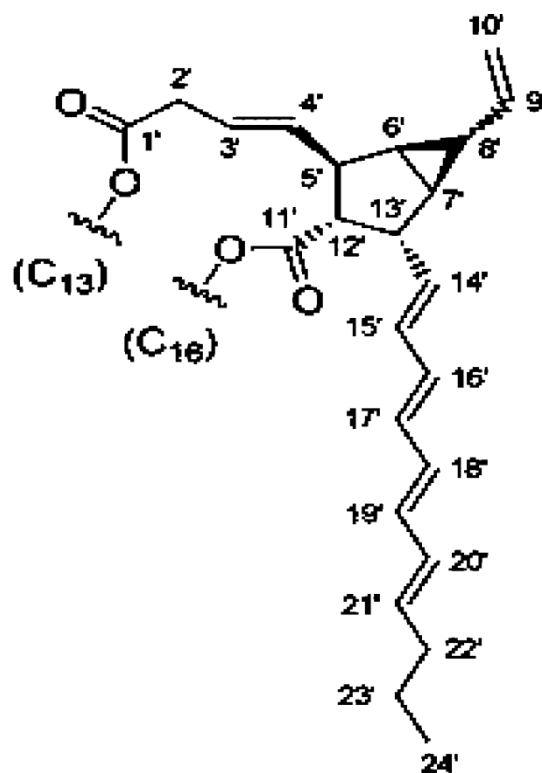


Figura 3 - Estrutura do 12-deoxi-16-hidroxiferbol, presente no óleo de semente de pinhão manso (GOEL *et. al.*, 2007).

#### 1.4. Importância dos plastídios no estudo de sementes de pinhão manso.

Como já citado acima, as sementes de pinhão manso são ricas em óleo, com potencial para produção de biodiesel; e contêm compostos tóxicos, os ésteres de forbol que limitam sua utilização. Ambos compostos vêm despertando um maior interesse no estudo das sementes de pinhão manso.

Tanto a síntese dos ácidos graxos, como a dos ésteres de forbol ocorrem nos plastídios, dessa forma, o estudo do proteoma desta organela poderá propiciar o conhecimento das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos, assim como das enzimas envolvidas na biossíntese dos ésteres de forbol.

##### 1.4.1. Plastídios

Os plastídios são organelas presentes nas células de plantas os quais desempenham funções biossintéticas e metabólicas essenciais (KLEFFMANN *et. al.*, 2007). Eles estão direta ou indiretamente envolvidos em processos importantes como na síntese de amido; na biossíntese de grupos fenólicos em aminoácidos aromáticos; na biossíntese de bases purínicas e pirimidínicas constituintes dos ácidos nucléicos; biossíntese de clorofila, bem como na biossíntese de ácidos graxos. Os isoprenóides, também chamado de terpenóides, incluindo carotenóides, esteróides e vários metabólitos secundários são produtos de vias anabólicas dos plastídios (NEUHAUS e EMES, 2000). A oxidação de carboidratos também pode ocorrer nos plastídios através da via oxidativa das pentoses fosfato. Vários fitohormônios incluindo ácido abscísico, derivados de isoprenóides e brassinosteróides são também derivados da atividade dos plastídios (LOPEZ-JUEZ e PYKE, 2005).

Segundo Cheniclet *et. al.* (1988) tanto cloroplastos quanto leucoplastos se originam a partir de proplastídios formados nas células meristemáticas. De acordo com Lopez-Juez e Pyke (2005) embriões e células não metabolicamente especializadas também contém proplastídios. Os proplastídios apresentam 0,2 a 1 $\mu$ M de diâmetro. Após a produção dos primeiros ribossomos, cada população de plastídio se diferencia de acordo com sua via de desenvolvimento.

Existem diversos tipos de plastídios: os amiloplastos, que são plastídios preenchidos por grãos de amido, gerados a partir da importação de produtos da fotossíntese; plastídios especializados no armazenamento de lipídios, os leucoplastos; plastídios com capacidade de acumular pigmentos, os cromoplastos; plastídios que atuam quando a luz é insuficiente

para os cotilédones de plântulas em germinação, os etioplastos (LOPEZ-JUEZ e PYKE, 2005).

#### 1.4.2. Proteômica de plastídios

Uma das técnicas mais utilizadas para a separação de proteínas na proteômica quantitativa é a eletroforese bidimensional. Os fundamentos dessa técnica foram apresentados pela primeira vez por O`Farrell e Klose em 1975.

A eletroforese bidimensional apresenta uma maior capacidade para separar misturas protéicas complexas quando comparada a eletroforese em uma dimensão. Nessa técnica as proteínas são separadas de acordo com duas propriedades físico-química intrínsecas da mesma. Dessa forma a eletroforese bidimensional ocorre em dois passos. No primeiro passo, primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI); no segundo passo, segunda dimensão, elas são separadas de acordo com seu volume molecular. Ou seja, a eletroforese 2-D resulta da combinação de duas técnicas; a focagem isoelétrica (IEF), seguida de uma separação por SDS-PAGE. Quando bem sucedida, obtém-se um gel de poliacrilamida contendo “spots” bem separados, cada um correspondendo a uma proteína, ou a uma forma protéica (SANTOS *et. al.*, 2005).

Atualmente as aplicações da eletroforese 2-D permitem uma alta resolução das várias espécies protéicas presentes numa amostra biológica, de uma forma reprodutível. Ela também permite separar as várias formas protéicas que tenham sofrido modificações pós-tradução. A separação destas formas é possível visto que essas modificações conferem propriedades diferentes à proteína, em particular, um diferente pI ou peso molecular. Após a separação protéica de uma amostra, a partir da eletroforese bidimensional, a identificação de suas proteínas pode ser realizada através da espectrometria de massa, viabilizando o estudo proteômico (LAMBERT *et. al.*, 2005).

Estudos proteômicos, direcionados para a obtenção de um maior conhecimento sobre as proteínas envolvidas na síntese de um determinado composto, tornam-se limitados quando realizados a partir do proteoma celular, o qual é formado por uma diversidade de produtos protéicos presentes nos diversos compartimentos celulares. Devido à possibilidade de fracionamento subcelular, proteomas de organelas podem ser definidos permitindo um melhor conhecimento sobre as proteínas presentes em um determinado compartimento subcelular (ANDERSEN e MANN, 2006).



Dessa forma, a proteômica do plastídio se mostra uma ferramenta promissora para ampliação do conhecimento sobre as enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e ésteres de forbol.

A disponibilidade de seqüências completas do genoma de plantas tem revelado a extensão e variedade de proteínas contidas nos plastídios (SOLL, 2002). Os plastídios dependem da importação de proteínas presentes no citosol, codificadas pelo núcleo, para executar suas múltiplas atividades biossintéticas (KLEFFMANN *et. al.*, 2007). Proteínas codificadas no núcleo são traduzidas no citoplasma e importadas para dentro dos plastídios, tendo um peptídeo sinal localizado na porção N-terminal das proteínas (SOLL, 2002). De acordo com Lopez-Juez e Pyke (2005), algoritmos têm sido desenvolvidos baseados nas propriedades desses peptídeos sinais e adicionalmente refinados em seqüências determinadas experimentalmente para identificação dos peptídeos transientes. Isso permite uma diferenciação das proteínas plastidiais codificadas *in situ*, daquelas provenientes do citosol, ampliando o conhecimento sobre as proteínas presentes nessa organela.

Diversos trabalhos foram realizados com o intuito de catalogar as proteínas detectadas diretamente de plastídios, como por Kleffmann *et. al.*(2007), Siddique *et. al.* (2006), Baginsky *et. al.* (2007), Rutschow *et. al.* (2008), Giacomelli *et. al.* (2006), Ytterberg *et. al.* (2006); Peltier *et. al.* (2006), utilizando a espectrometria de massa como ferramenta. Dois bancos de dados de proteínas de plastídios vêm sendo produzidos o PLprot e o Plastid Proteome Database (PPDB) (LOPEZ-JUEZ e PYKE, 2005).

A meta dos estudos de proteômica de organelas é analisar uma amostra protéica originada a partir de preparações o mais enriquecida possível da organela de interesse, e que a contribuição de outras estruturas subcelulares seja minimizada (GAUTIER e LARUZE, 2008). Dessa forma, é fundamental ter conhecimento a respeito dos principais métodos utilizados para o isolamento de organelas e, mais especificamente, de plastídios, para que o proteoma dos mesmos possa ser determinado.

### **1.5. Principais métodos utilizados para isolamento de organelas**

Segundo Huber *et. al.*, (2003), processo de centrifugação em gradiente de densidade é o método mais eficaz para o isolamento de uma determinada organela. Ela vem sendo aplicada para a obtenção de uma fração enriquecida de uma determinada organela devido ao fato dos diversos compartimentos celulares possuírem uma densidade específica, que varia de acordo com sua natureza e composição, que é relativamente distinta das outras organelas (PASQUALI *et. al.*, 1999).

A composição do gradiente interfere no padrão de sedimentação dos compartimentos subcelulares. Os meios de centrifugação devem proporcionar uma ampla faixa de densidade utilizando concentrações convenientes, para que as organelas não sejam modificadas. Dessa forma, alterações na osmolaridade devem ser evitadas ao máximo.

Segundo Stasyk e Hirber, (2004), a sacarose ainda é um meio bastante utilizado para a produção de gradientes, apesar de algumas de suas propriedades, incluindo elevada osmolaridade e viscosidade, poderem vir a ser um problema em certas circunstâncias (PERTOFT, 2000).

Compostos alternativos têm sido desenvolvidos para evitar esses problemas. Um polímero sintético de sacarose conhecido como Ficoll pode ser introduzido para minimizar efeitos hiperosmóticos, entretanto ele não é inteiramente bem sucedido em todas as concentrações. Dextran, um polímero natural de sacarose, tem sido utilizado no fracionamento de componentes celulares, entretanto ele é bastante viscoso (STECK *et. al.*, 1970). Muitas outras moléculas como compostos de iodo, Metrizamida, Nycodenz, Optiprep, por exemplo, como também de sílica coloidal, o Percoll, são também empregadas, cada uma com suas características próprias, e todas tendo em vista atingir a máxima separação enquanto minimiza alterações na amostra.

Os gradientes de densidade podem ser contínuos, no qual a densidade aumenta linearmente ao longo do tubo, ou descontínuo, no qual o gradiente é dividido em porções de densidades fixas (GAUTIER e LARUZE, 2008). Os gradientes contínuos apresentam a desvantagem de o enriquecimento de organelas ser baixo, resultando em frações bastante diluídas. Enquanto centrifugações utilizando gradientes descontínuos podem atingir a separação quase completa das partículas de uma forma conveniente e de baixo custo (HUBER *et. al.*, 2003).

### **1.5.1. Métodos utilizados para o isolamento de leucoplastos**

Diferentes métodos podem ser aplicados para o isolamento de leucoplastos, desde os mais simples, como sedimentação simples, até sedimentação por taxa zonal, o qual permite uma preparação mais pura em relação ao primeiro. Dentre esses pode-se citar o uso de gradiente descontínuo de açúcares.

O uso de gradiente descontínuo de sacarose ou de outros açúcares como o Metrizamida ou Nycondenz, por exemplo, permite a preparação adequada de plastídios para diversos estudos. Esse tipo de gradiente parece ser eficiente na preparação de plastídios

livres de contaminação mitocondrial. Contudo não garante uma separação eficiente dos peroxissomos. Outra limitação desse método está no fato de que a desidratação das organelas causada por uma alta concentração de açúcar resulta em danos osmóticos às membranas. Isso pode resultar em plastídios inadequados para vários experimentos fisiológicos ou de transporte (MIERNIK, 1989).

O problema da desidratação, observado no uso de gradiente descontínuo de sacarose, pode ser resolvido por meio do uso de soluções coloidais de sílica como o Percoll. A baixa osmolaridade das soluções coloidais de sílica permite formação de gradientes que são aproximadamente isosmóticos, e a baixa viscosidade permite a separação de equivalentes em menos tempo e a obtenção de preparações mais puras (MIERNIK, 1985).

O polietilenoglicol (PEG) pode ser acrescentado à solução de Percoll para evitar a contaminação de organelas de membrana simples, pois a posição dessas organelas é muito sensível à inclusão com PEG. Dessa forma a posição dos peroxissomos (organela de membrana simples) nestes gradientes pode ser alterada de modo que eles não sejam um contaminante significativo. Leucoplastos isolados de endosperma em desenvolvimento de *R. communis* e purificados pela sedimentação por taxa zonal em gradientes descontínuos de Percoll foram utilizados no estudo da captação e processamento de proteínas precursoras de plastídios sintetizadas *in vitro* (MIERNIK, 1985).

O estudo do proteoma dos leucoplastos de sementes de pinhão manso apresenta bastante relevância na medida em que o mesmo pode proporcionar a identificação de proteínas envolvidas na síntese de ésteres de forbol, como também no metabolismo de lipídios e que podem estar relacionadas com a produção de óleo com padrões aplicáveis à produção de biodiesel.

O presente trabalho busca obter uma fração enriquecida de plastídios, para aquisição de um maior conhecimento sobre as proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e ésteres de forbol, através do estudo proteômico dessa organela. Para tanto, conhecimento morfológico, histológico e histoquímico da semente em desenvolvimento, se torna fundamental para a escolha do estágio do desenvolvimento mais adequado para o isolamento de plastídio.

Estudos envolvendo a caracterização morfológica de sementes do pinhão manso foram realizados como relata o próximo item.

## 1.6. Caracterização morfológica de sementes de pinhão manso

A utilização de critérios morfológicos para seleção de sementes durante o seu desenvolvimento é de grande importância para estudos fisiológicos, bem como bioquímicos. Tal caracterização reduz a variabilidade nas determinações experimentais e aumenta a confiabilidade das comparações feitas entre vários tratamentos experimentais (GREENWOOD e BEWLEY, 1982).

A atribuição de marcadores morfológicos no estabelecimento de estágios bem definidos nas sementes em desenvolvimento vem sendo adotada em diferentes espécies de dicotiledôneas, no entanto tais critérios não têm sido claramente estabelecidos para pinhão manso. Nunes (2007) realizou estudos morfológicos com sementes de pinhão manso, entretanto nesse trabalho apenas a caracterização morfológica externa da semente madura foi analisada. Gusman e Aquino (2009) analisaram características morfológicas da semente e de plântulas de pinhão manso, como também fizeram análise de propriedades físicas e químicas da semente, contudo a morfologia da semente em diferentes estágios de desenvolvimento não foi estudada.

Nesse contexto, torna-se interessante ser feita uma caracterização morfológica mais acurada, que possibilite estabelecer uma diferenciação dos diversos estágios do desenvolvimento da semente, levando-se em consideração, além dos caracteres morfológicos externos, aspectos das estruturas internas durante todo o desenvolvimento da semente.

Estudos anatômicos de sementes em desenvolvimento também contribuem para um maior conhecimento sobre o processo de diferenciação dos tecidos. O conhecimento a respeito do estágio do desenvolvimento da semente em que se inicia a formação do endosperma, por exemplo, não somente é importante atuando como um fator de caracterização do seu desenvolvimento, como também norteando o estágio adequado para se iniciar a análise de deposição de diferentes compostos, como proteínas, carboidratos e lipídio nesse tecido.

A escolha do estágio do desenvolvimento da semente, mais adequado para o isolamento de plastídios, pode ser feita a partir de observações sobre o padrão de deposição de lipídios e proteínas no endosperma. Esse tecido além de ser uma importante fonte de alimentos é fonte de matéria prima para a fabricação de diversos produtos industriais incluindo bicompostíveis (WANG, *et. al.*, 2009). No presente trabalho ele é apropriado para o processo de isolamento de plastídios no pinhão manso devido à presença de ésteres de forbol e de lipídios no mesmo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Obter uma fração enriquecida de plastídios a partir do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar morfológicamente os estágios do desenvolvimento da semente.
- Caracterizar o processo de deposição de reservas durante o desenvolvimento das sementes, a partir de análises histológicas e histoquímicas.
- Estabelecer o estágio do desenvolvimento da semente em que se iniciam a formação do endosperma e a deposição de lipídios e proteínas.
- Estabelecer um protocolo de isolamento de plastídios do endosperma de sementes em desenvolvimento e avaliar a homogeneidade das preparações obtidas por microscopia eletrônica.
- Elaborar mapas proteômicos bi-dimensionais das proteínas extraídas das preparações de plastídios.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Caracterização Morfológica, histológica e histoquímica**

##### **3.1.1. Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento da semente de pinhão manso**

Flores femininas de plantas de *J. curcas* cultivadas em campo no Campus do Pici, em área sob responsabilidade do Departamento de Fitotecnia, foram marcadas no dia da sua abertura. Nos dias 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 dias após a antese (DAA), os frutos foram coletados (Figura 4), e as sementes foram isoladas para determinação de suas massas fresca e seca em balança analítica, bem como do comprimento, largura (diâmetro maior), espessura (diâmetro menor) e tamanho do embrião com o uso de paquímetro. A caracterização da cor e textura da casca da semente também foi analisada. Tais experimentos foram realizados com 10 sementes de cada dia após a antese (DAA), sendo feito três repetições.

##### **3.1.2. Determinação da massa fresca e massa seca de sementes em desenvolvimento de pinhão manso**

A massa fresca total das sementes de pinhão manso com 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA foi determinada em balança analítica. Em seguida as sementes foram transferidas para estufa, onde permaneceram por 24 horas, a 100 °C. Transcorrido as 24 horas, as sementes foram colocadas em dessecador e imediatamente pesadas em balança analítica, para determinação da massa seca.

##### **3.1.3. Análises histológicas de sementes em desenvolvimento de pinhão manso**

Sementes de *J. curcas* em desenvolvimento, com 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 dias após a antese (DAA) foram coletadas na Taíba, Distrito de São Gonçalo do Amarante, e armazenadas em frascos contendo o fixador Karnovsky (KARNOVSKY,1965) por no mínimo 48 horas. As amostras das sementes em desenvolvimento imersas em Karnovsky foram então lavadas 4 vezes por cinco minutos com tampão fosfato 0,2M e em seguida passaram por um processo de desidratação em concentrações crescentes de etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%), por uma hora em cada concentração. Após a desidratação as amostras foram postas em solução de pré-infiltração (50% álcool e 50% de resina básica LEICA HISTORESIN Embedding Kit), sob vácuo. Após 48 horas as amostras foram postas na solução de infiltração (LEICA HISTORESIN Embedding Kit) permanecendo nesta por 10 dias sob pressão negativa.



Figura 4: Desenvolvimento de sementes de pinhão manso (*J. curcas*). A: campo experimental; B: flor após a antese; C: fruto em desenvolvimento com a etiqueta marcando sua idade.

Secções de 5µm, obtidas em micrótopo LEICA 2065, foram coradas com azul de toluidina 0,12%-Bórax 5% durante 10 minutos e Fucsina Básica 0.025% durante 1 minuto. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz.

#### **3.1.4. Análises histoquímicas de sementes em desenvolvimento de pinhão manso**

Análises histoquímicas de endosperma sementes de pinhão manso (*J. curcas*) em desenvolvimento com 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA, estágios em que o endosperma pode ser bem visualizado, foram realizadas utilizando-se reagentes específicos à identificação de lipídios e proteínas.

Para determinação de lipídios, cortes frescos a mão livre foram realizados no endosperma de sementes em desenvolvimento nos estágios acima citados e colocados em contato com Sudan IV, 2% em etanol 92%, por 30 minutos. Em seguida foram lavados rapidamente em uma série decrescente de etanol 70%, 50% e 30% finalizando com água. Em seguida os cortes mais finos foram selecionados para serem analisados imediatamente em microscópio de luz. A coloração vermelha de estruturas nas células do endosperma indica presença de lipídios.

Para detecção de proteínas as amostras do endosperma das sementes em desenvolvimento nos diferentes estágios, acima citados, foram imersas em Karnovsky e então lavadas 4 vezes por cinco minutos com tampão fosfato 0,2M e em seguida passaram por um processo de desidratação em concentrações crescentes de etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%), por uma hora em cada concentração. Após a desidratação as amostras foram postas em solução de pré-infiltração (50% álcool e 50% de resina básica LEICA HISTORESIN Embedding Kit), sob vácuo. Após 48 horas as amostras foram postas na solução de infiltração (LEICA HISTORESIN Embedding Kit) permanecendo nesta por 10 dias sob pressão negativa.

Secções de 5µm, obtidas em micrótopo LEICA 2065, foram coradas com Xylidine poceau (XP) 0,1% em ácido acético 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida lavadas com ácido acético 3% por 15 minutos, e posteriormente lavados 2 vezes, rapidamente, em água. Após montagem em entelan foram analisados em microscópio de luz. A coloração vermelha de estruturas nas células do endosperma indica presença de proteínas.



### 3.1.5. Análise de sementes em desenvolvimento de pinhão manso por microscopia eletrônica de transmissão - MET

Endosperma de sementes de pinhão-manso nos estágios em que precede (25 DAA), se inicia (30 e 35 DAA) e posterior (45DAA) à deposição de proteínas e lipídios, foram fixados em Karnovsky, em seguida foram lavados em tampão cacodilato 0,05M durante 10 minutos por três vezes. As amostras foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% durante uma hora, sendo em seguida lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,05M durante 15 minutos e posteriormente foram desidratadas em soluções de concentrações de álcool progressivamente crescentes de 15%, 30%, 50%, 85%, 90% (2 vezes) e 100% (3 vezes) durante 20 minutos em cada solução. As amostras foram infiltradas em proporções crescentes de resina L.R.White/etanol, finalizando o processo de infiltração, após 4 dias, com os explantes imersos em solução de L.R.White puro. Em seguida as amostras foram incluídas em solução de L.R.White com ativador, durante 3 dias, sob luz UV e refrigeração, para possibilitar a polimerização. As amostras infiltradas foram primeiramente submetidas a cortes semi-finos de 500nm para uma triagem do material antes da visualização ao microscópio eletrônico. Esses cortes foram feitos em ultramicrótomo, Leica Ultracut UCT da Leica, utilizando-se facas de diamante, colocados em lâminas sob água, secos em chapa quente, e corados em azul de toluidina e observados em microscópio óptico, Axioskop, da Carl Zeiss. Após essa triagem, trocou-se a espessura de corte para 60nm (cortes ultrafinos) utilizando-se facas de diamante. Esses cortes foram coletados em grades de cobre de 200 mesh cobertas com formvar e carbono. O contraste dos cortes foi em seguida realizado com acetato de uranila 2%, durante 1 hora, e visualizados diretamente em microscópio eletrônico.

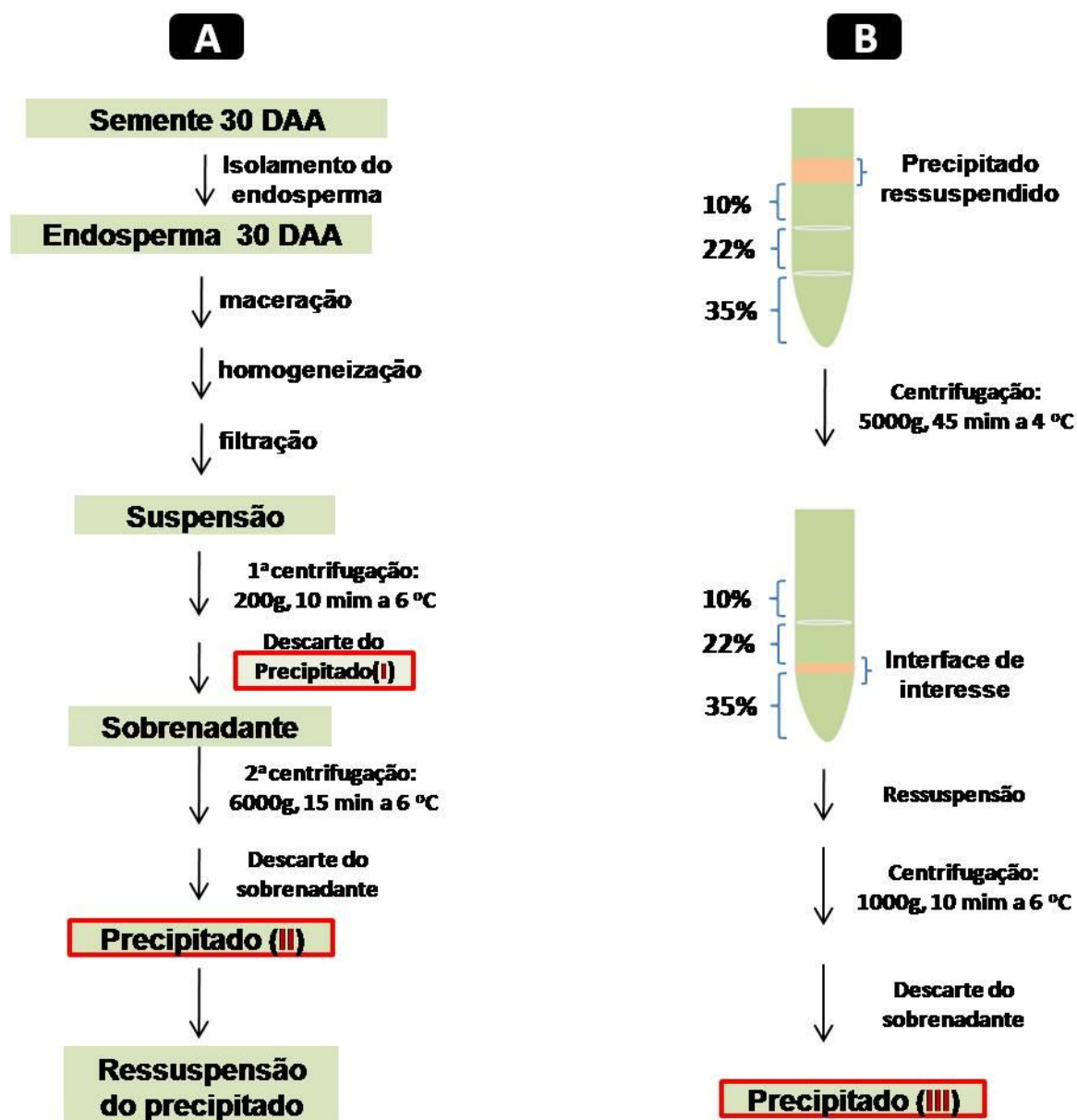
### 3.2. Isolamento de plastídios de endosperma de sementes de pinhão manso

Endosperma de sementes de pinhão manso com características semelhantes às observadas com as de sementes com 30 DAA foi o único tecido a ser utilizado durante a metodologia aplicada para a obtenção de uma fração enriquecida de plastídios. A eliminação da casca, integumento e do eixo embrionário foram feitos manualmente.

Para a obtenção da fração enriquecida de plastídios foi adotada a seguinte metodologia: Primeiramente, 15g de endosperma foram isolados e imersos em 5ml de tampão de homogeneização (T.H) contendo albumina sérica bovina (BSA). O material foi picotado e em seguida homogeneizado em 10 ml de T.H com BSA, durante 10 minutos. Após a homogeneização, o material foi filtrado em membrana *cheesecloth*. O material retido

na membrana foi novamente homogeneizado em 10 ml de T.H com BSA durante 10 minutos. O filtrado foi, então, centrifugado a 200g, durante 10 minutos, a 6 °C. O precipitado (fração I) (**Figura 5A(I)**) foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado a 6000g, durante 15 minutos, a 6 °C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado (fração II) (**Figura 5A(II)**) foi ressuspensa em 2,5ml de T.H sem BSA. Doravante, fração será denominada de fração enriquecida em organelas.

No topo de um tubo falcon com gradiente descontínuo de PBF-Percoll 10%-22%-35%, foi colocada a fração II, ressuspensa em 2,5ml T.H sem BSA. Essa amostra foi então centrifugada em rotor *swing-out* a 5000g, durante 45 minutos, com aceleração 8, e desaceleração zero, a 4 °C (**Figura 5B**). A banda formada na interface da camada 22-35%, foi coletada e diluída com 20 ml de T.H sem BSA e em seguida centrifugada a 1000g, durante 10 minutos, a 6 °C, seguido de descarte do sobrenadante. O precipitado obtido (fração III) (**Figura 5B(III)**) será doravante denominado de fração enriquecida em plastídios. A composição das frações I, II e III foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET).



**Figura 5:** Esquema do processo utilizado para o isolamento plastidial. **A.** Primeiros passos de centrifugação, com obtenção das frações I e II (precipitado I e II, respectivamente). **B.** Fase envolvendo montagem do gradiente de PBF-Percoll, com posterior obtenção da interfase de interesse, onde se espera encontrar uma fração enriquecida de plastídios na fração III (precipitado III).

### **3.3. Processamento das frações I, II e III para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As frações I, II e III, foram fixadas em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) em seguida foram lavados em tampão cacodilato 0,05M durante 10 minutos por três vezes. As amostras foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% durante uma hora, sendo em seguida lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,05M durante 15 minutos. Posteriormente foram desidratadas em soluções de álcool de concentrações progressivamente crescentes de 15%, 30%, 50%, 85%, 90%, duas vezes consecutivas e 100%, três vezes consecutivas, durante 20 minutos em cada solução. As amostras permaneceram em álcool 100% refrigerado até serem levadas ao aparelho de secagem ao ponto crítico, modelo CPD 030 da BAL-TEC, onde foi realizada a troca de solvente (etanol por CO<sub>2</sub> líquido) e secagem. Após atingir o ponto crítico as amostras foram montadas em "stubs" (suporte metálico) de alumínio e levadas ao metalizador, modelo K550, da Emitech, onde receberam um banho de vapor de ouro durante 2,5 minutos, em corrente de 35µA. Em seguida o material foi analisado no microscópio eletrônico de varredura, modelo DSM 962, da Zeiss, com voltagem de 10kV e corrente de 80µA.

### **3.4. Processamento das frações I, II, III para análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As frações I, II e III foram fixadas, pós-fixadas e desidratadas como descrito anteriormente. As amostras foram infiltradas em concentrações crescentes de resina L.R.White em etanol, finalizando o processo de infiltração, após 4 dias, com os explantes imersos em solução de L.R.White puro. Em seguida as amostras foram incluídas em solução de L.R.White com ativador, durante 3 dias, sob luz UV e refrigeração, para possibilitar a polimerização. As amostras infiltradas foram primeiramente submetidas a cortes semi-finos de 500nm para uma triagem do material antes da visualização ao microscópio eletrônico de transmissão. Esses cortes foram feitos em ultramicrótomo, modelo Leica Ultracut UCT, da Leica, utilizando-se facas de diamante, colocados em lâminas sob água, secos em chapa quente, e corados em azul de toluidina e observados em microscópio óptico, Axioskop, da Carl Zeiss. Após essa triagem, trocou-se a espessura de corte para 60nm (cortes ultrafinos) utilizando-se facas de diamante. Esses cortes foram coletados em grades de cobre de 200 mesh cobertas com formvar (revestimento que estabiliza o material e oferece melhor apoio para os cortes) e carbono (estabiliza o filme de formavar durante a exposição aos feixes de elétrons). O contraste dos cortes foi em seguida realizado com

acetato de uranila 2%, durante 1 hora. Os cortes foram visualizados diretamente em microscópio eletrônico de transmissão, Jeol 1011, operando a 80 kV.

### **3.5. Estabelecimento de mapas bidimensionais da fração enriquecida de organelas (fração II) e da fração enriquecida de plastídios (fração III)**

#### **3.5.1. Extração de proteínas totais com tampão piridina**

Para a extração de proteínas totais da fração enriquecida de organelas e da fração enriquecida de plastídios foi utilizado o método descrito por Vasconcelos *et. al.* (2005). Cada uma dessas frações foram, separadamente, misturadas com tampão contendo piridina 50 mM, tiouréia 10 mM, SDS 1%, pH 5,0 na proporção de 1:40 (p/v), em seguida adicionada polivinilpirrolidona (PVPP), em quantidade igual a duas vezes a massa da amostra. A mistura ficou sob forte agitação a 4°C por duas horas e o material, centrifugado a 10.000 g por 40 min. Ao sobrenadante foram adicionados quatro volumes (1:5, volume do sobrenadante/volume total) de acetona gelada contendo 10% de ácido tricloroacético (TCA) para permitir a precipitação. O precipitado estocado por duas horas (ou durante a noite) a – 20°C foi então centrifugado a 10.000 g por 20 min e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo as proteínas totais em acetona gelada (100 µl/mg do material de partida) foi agitado até adquirir o aspecto de suspensão, sendo em seguida centrifugado a 10.000 g por 5 min e o sobrenadante descartado. A lavagem foi realizada no mínimo duas vezes para livrar a amostra de qualquer traço de TCA. O precipitado final seco a vácuo no dessecador foi estocado para posterior processamento. Para a dosagem de proteínas foi adotado o método de Bradford (1976).

#### **3.5.2. Dosagem de proteínas**

O método de Bradford (1976) foi empregado para avaliar a quantidade de proteínas obtidas durante o processo de extração da fração enriquecida de organelas e da fração enriquecida de plastídios e estipular a quantidade de proteínas a ser utilizada nos subseqüentes experimentos.

#### **3.5.3. Eletroforese bidimensional, revelação e análise da imagem**

Alíquotas das amostras da fração enriquecida de organelas e da fração enriquecida de plastídios, já quantificadas quanto ao teor protéico, foram dissolvidas/ diluídas na solução de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 65 mM, CHAPS 1% p/v, pharmalyte 0,5% v/v e azul de bromofenol 0,002% p/v) para um volume final de 200 µl. O sistema IPGphor foi utilizado para reidratação ativa e focalização isoeletrica da GE HealthCare de acordo com

programas previamente definidos. Após a focalização as tiras de IPG foram equilibradas sob agitação em solução (tris 50 mM, glicerol 30 %, uréia 6M, SDS 2% e azul de bromofenol) com DTT (1% p/v) por 15 minutos, para a redução das proteínas e, em seguida, alquiladas com IAA (3% p/v) também em solução de equilíbrio por 15 minutos. Terminado o equilíbrio as tiras, após lavagem rápida no tampão de corrida para livrá-los do excesso de solução de equilíbrio, foram levadas ao topo do gel da segunda dimensão e cobertas com tampão de corrida. O SDS-PAGE da segunda dimensão foi realizado em sistema vertical em géis 15% de 14 x 14 cm. Os 15 primeiros minutos da corrida ocorreu a 10 mA/gel, em seguida a 20 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel. Terminada a corrida, o gel foi corado com Coomassie Phast Gel Blue R 350 e armazenado em solução de glicerol 5%.

Os géis foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v. 5.0 (GEHealthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences) com sistema integrado de transparência, em seguida foram submetidos à análise utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Caracterização morfológica, anatômica e histoquímica de sementes em desenvolvimento de pinhão manso**

Experimentos preliminares foram realizados para determinação do estágio de desenvolvimento da semente mais adequado para o isolamento de plastídios presentes no endosperma de sementes de pinhão manso.

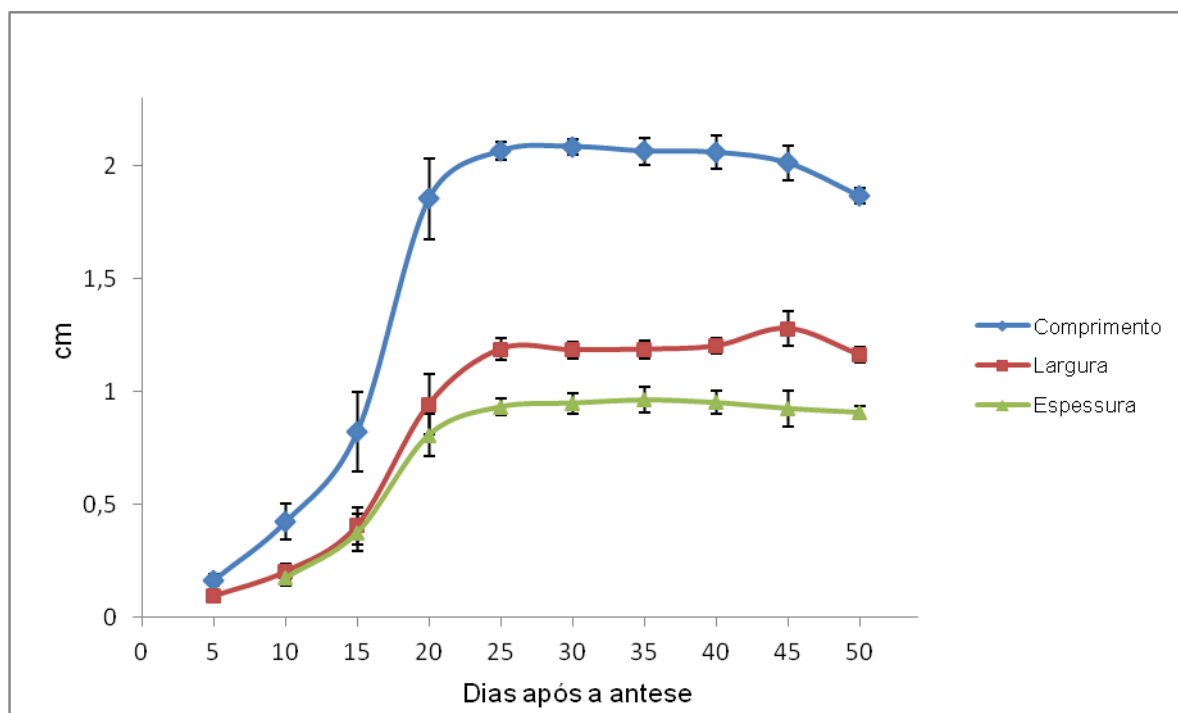
Os parâmetros utilizados para tal escolha se basearam em caracterizações morfológica, anatômica e histoquímica.

#### **4.1.1. Dimensões de sementes em desenvolvimento de pinhão manso**

Durante o desenvolvimento da semente de pinhão manso, foram mensurados o comprimento, a largura e a espessura das sementes com 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA. A partir dessa análise foi possível observar que ocorre um aumento dessas medidas até 25 DAA, mantendo-se constante até os 45 DAA, a partir do qual é observado um leve decréscimo (**Figura 6**).

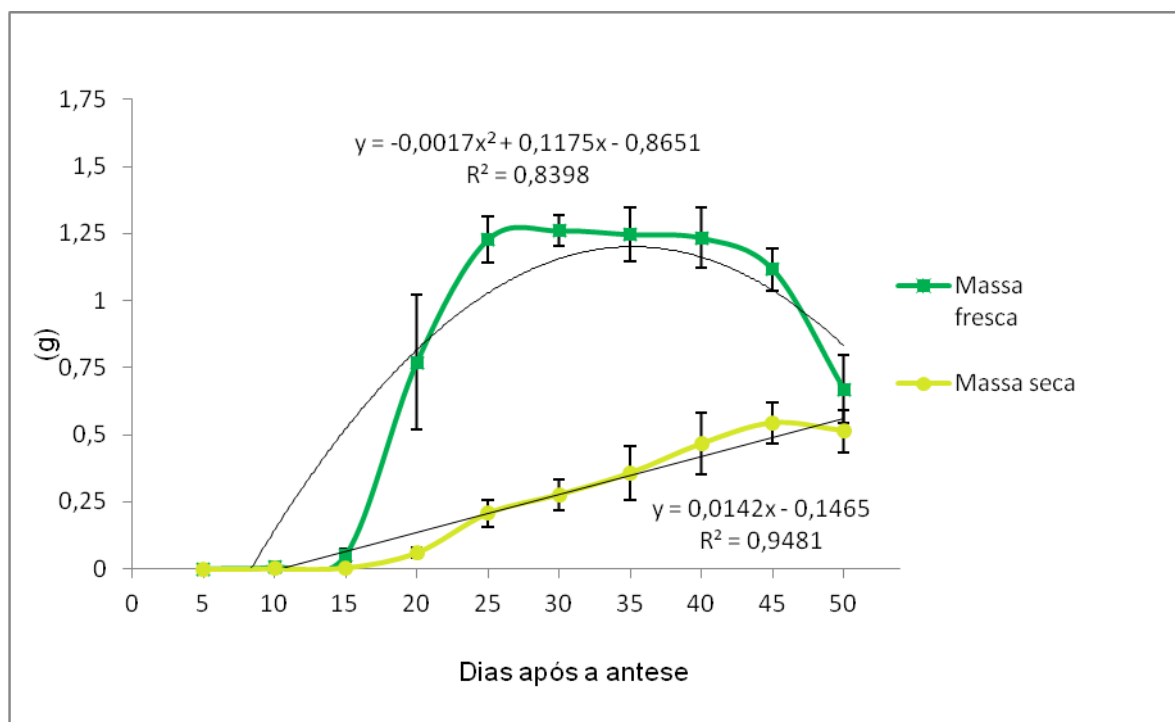
#### **4.1.2. Determinação das curvas de massa fresca e massa seca de sementes em desenvolvimento de pinhão manso**

Através da análise da massa fresca e seca de sementes em desenvolvimento de pinhão manso com 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA, pode-se observar que, os dados de massa fresca ajustaram-se bem a um modelo de equação polinomial quadrática, apresentando um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,8418. Aos 15 DAA a curva é crescente atingindo um máximo em torno dos 30 DAA, mantendo-se constante até 40 DAA, a partir do qual ocorre um decréscimo gradual da massa fresca, com uma perda de massa fresca mais acentuada observada aos 50 DAA. Quanto aos dados de massa seca, esses melhor se ajustaram a um modelo de equação linear, apresentando um coeficiente de determinação igual a 0,9471. À medida que a semente se desenvolve ocorre um aumento gradual da massa seca, a qual atinge seu valor máximo aos 45 DAA, conservando-se, praticamente inalterado, até os 50 DAA. As informações aqui descritas podem ser observadas na **Figura 7**.



**Figura 6:** Gráfico de dimensões da semente de pinhão manso em desenvolvimento.





**Figura 7:** Curvas de massa fresca e massa seca de sementes de pinhão manso em desenvolvimento

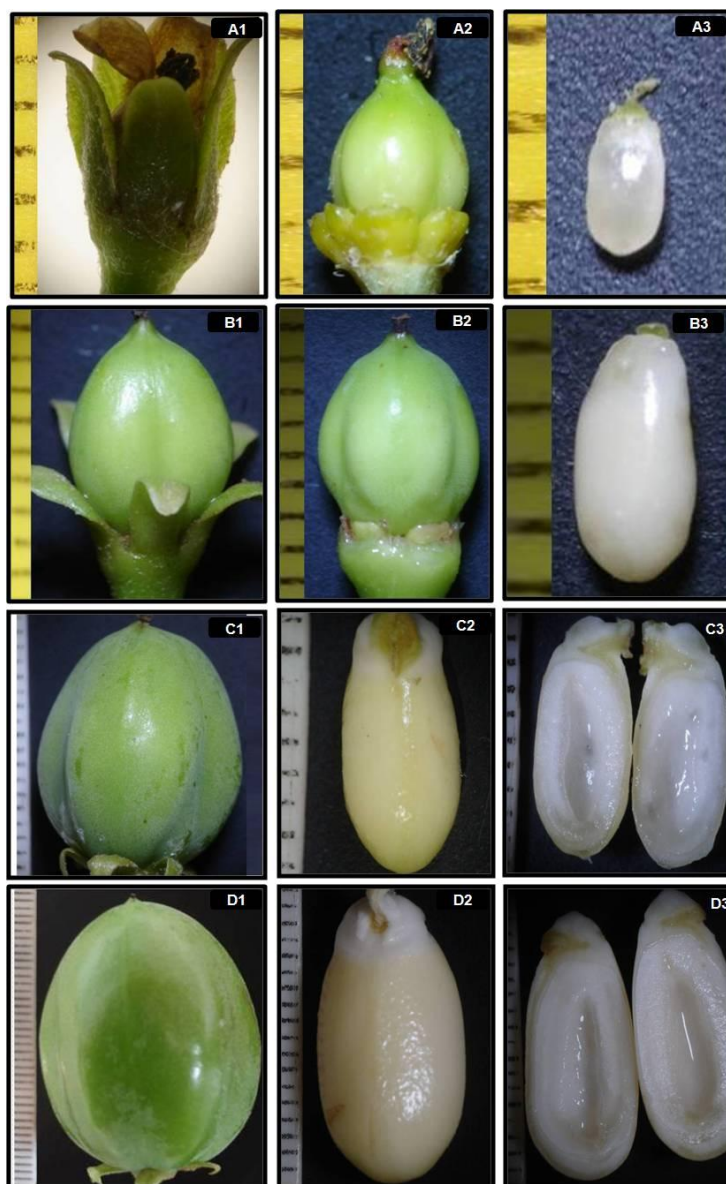
#### 4.1.3. Caracterização morfológica de sementes em desenvolvimento de pinhão manso

Frutos com **5** dias após a antese (DAA) apresentam-se rodeados pelas pétalas, em processo de senescência, e pelas sépalas (**Figura 8. A1**). Os nectários ainda estão bem evidentes e já é possível observar o ovário se desenvolvendo, com a diferenciação dos três carpelos (**Figura 8. A2**). As sementes são diminutas, com coloração branco – translúcido (**Figura 8 A3**). Elas apresentam uma média de 1,6 mm de comprimento; 0,91 mm de diâmetro (**Figura 6**); massa fresca de 0,00039g e massa seca de 0,00007g (**Figura 7**).

Com **10** DAA, o ovário tri - carpelar em desenvolvimento sofre aumento considerável, as sépalas que o rodeiam não mais o recobrem completamente (**Figura 8 B1**). Os nectários, embora ainda presentes, estão bem menores (**Figura 8 B2**). As sementes passam a ser menos translúcidas com coloração esbranquiçada, mais opaca (**Figura 8 B3**), além de possuírem dimensões maiores, medindo 4,2 mm de comprimento; 2 mm largura e 1,73mm de espessura (**Figura 6**); e pesando 0,0074g e 0,0007g de massa fresca e seca respectivamente (**Figura 7**).

A partir do dia **15** após a antese, o fruto de coloração verde está mais volumoso, apresentando 1,9 cm de comprimento e 1,39 cm de diâmetro (**Figura 8 C1**). As sementes passam a adquirir uma coloração amarelo – esbranquiçado (**Figura 8 C2**). Nesse estágio, o tecido nutritivo predominante ainda é o integumento interno, além do que, é possível ver o início da diferenciação do mesmo (**Figura 8 C3**). As sementes apresentam as seguintes dimensões 8,18 mm de comprimento, 4,03 mm de largura e 3,73 mm de espessura (**Figura 6**); as médias das massas fresca e seca foram de 0,051g e 0,004g, respectivamente (**Figura 7**).

Após **20** dias da antese o fruto apresenta 3,0 cm de comprimento e 2,6 cm de diâmetro (**Figura 8 D1**). A testa em formação da semente ainda é bastante delicada (**Figura 8 D2**) e o integumento interno ainda predomina como tecido nutritivo (**Figura 8 D3**). As sementes apresentam 1,85 cm de comprimento, 0,94 cm de largura e 0,8 cm de espessura (**Figura 6**); as médias das massas fresca e seca foram de 0,77g e 0,06g, respectivamente (**Figura 7**).

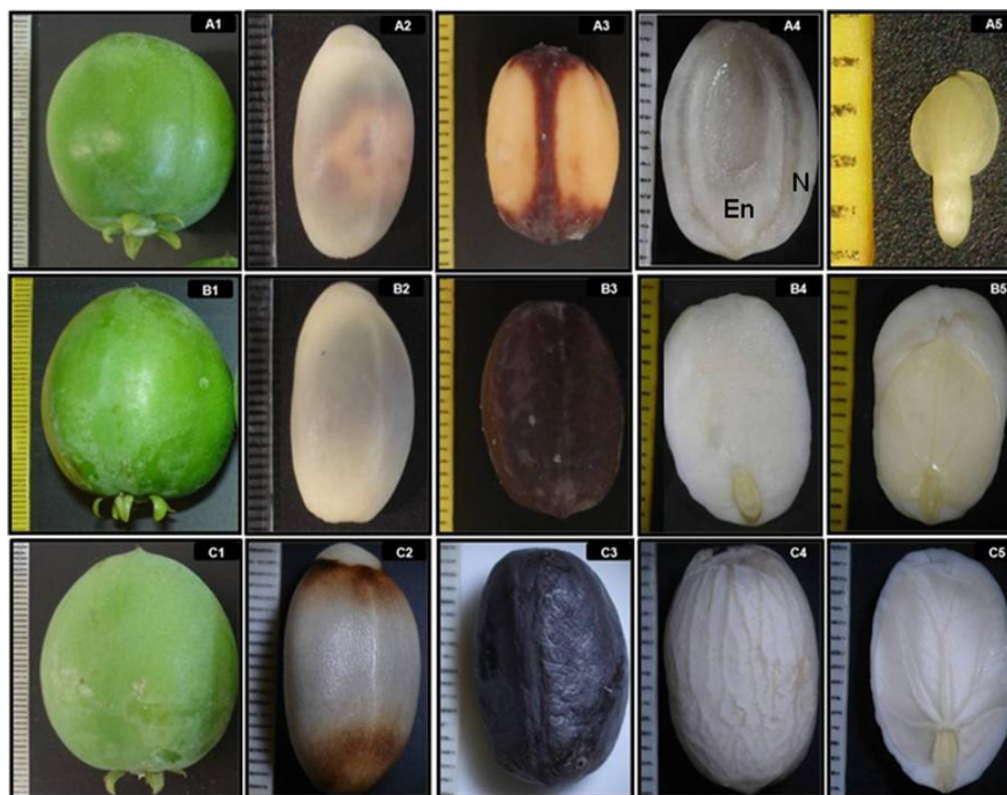


**Figura 8:** Caracterização morfológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento, aos 5 (A), 10(B), 15(C) e 20(D) DAA. **5DAA:** A1. fruto; A2. Nectário evidente. A3. semente. **10DAA:** B1. fruto B2. nectário se degenerando B3. Semente. **15DAA:** C1. fruto C2. semente C3. Parte interna da semente. **20DAA:** D1. fruto D2. semente D3. Porção interna da semente.

Com **25 DAA**, o fruto apresenta 3,18 cm de comprimento e 3,05 cm de diâmetro (**Figura 9 A1**). A testa da semente em formação passa a ser bem mais perceptível, com um tegumento externo branco translúcido (**Figura 9 A2**) e um interno com textura rígida e coloração amarelo alaranjado ou amarelo alaranjado com porções escurecidas (**Figura 9 A3**). A partir da abertura da semente é possível diferenciar o endosperma do integumento (**Figura 9 A4**). Dessa forma, as análises histoquímicas foram iniciadas nesse estágio. Fazendo-se um corte longitudinal da semente sem a testa (integumento externo), percebe-se a presença de três camadas, uma camada mais externa, o integumento interno, sendo densa; uma mais intermediária, o endosperma celularizado em formação; e o centro da semente apresentando-se mais fluido, endosperma nuclear (**Figura 9 A4**). O eixo embrionário nesse estágio apresenta-se no estágio cotiledonar (**Figura 9 A5**). As sementes apresentam as seguintes dimensões 2,06 cm de comprimento, 1,18 cm de largura e 0,93 cm de espessura (**Figura 6**); as médias das massas fresca e seca foram de 1,22g e 0,2g, respectivamente (**Figura 7**).

Com **30 DAA**, o fruto apresenta 3,17 cm de comprimento e 3,05 cm de diâmetro (**Figura 9 B1**). A testa das sementes apresenta um tegumento externo (exotesta) branco translúcido (**Figura 9 B2**) e um interno (endotesta) com textura rígida e coloração preta amarronzada (**Figura 9 B3**). O endosperma, rodeando a semente, já ocupa quase que completamente o interior da mesma (**Figura 9 B4**), restando apenas uma fina película membranosa de integumento interno. O comprimento do eixo embrionário é aproximadamente 2/3 do comprimento da semente (**Figura 9 B5**). As sementes apresentam as seguintes dimensões 2,08 cm de comprimento, 1,18 cm de largura e 0,94 cm de espessura (**Figura 6**); as médias das massas fresca e seca foram de 1,26g e 0,27g, respectivamente (**Figura 7**).

Com **35 DAA**, o fruto apresenta 3,07 cm de comprimento e 2,94 cm de diâmetro (**Figura 9 C1**). As sementes apresentaram testa com tegumento externo (exotesta) branco translúcido, amarronzada nas extremidades (**Figura 9 C2**) e com tegumento interno (endotesta) escuro (preto amarronzado) rígido e quebradiço (**Figura 9 C3**). O eixo embrionário atinge seu tamanho máximo a partir desse estágio, ele, juntamente com o endosperma que o rodeia, ocupam quase que completamente o interior da semente (**Figura 9 C5**), restando apenas uma fina película membranosa de integumento interno (**Figura 9 C4**). As sementes apresentam as seguintes dimensões 2,06 cm de comprimento; 1,18 mm de largura e 0,96 mm de espessura (**Figura 6**); as médias das massas fresca e seca foram de 1,24g e 0,35g, respectivamente (**Figura 7**).



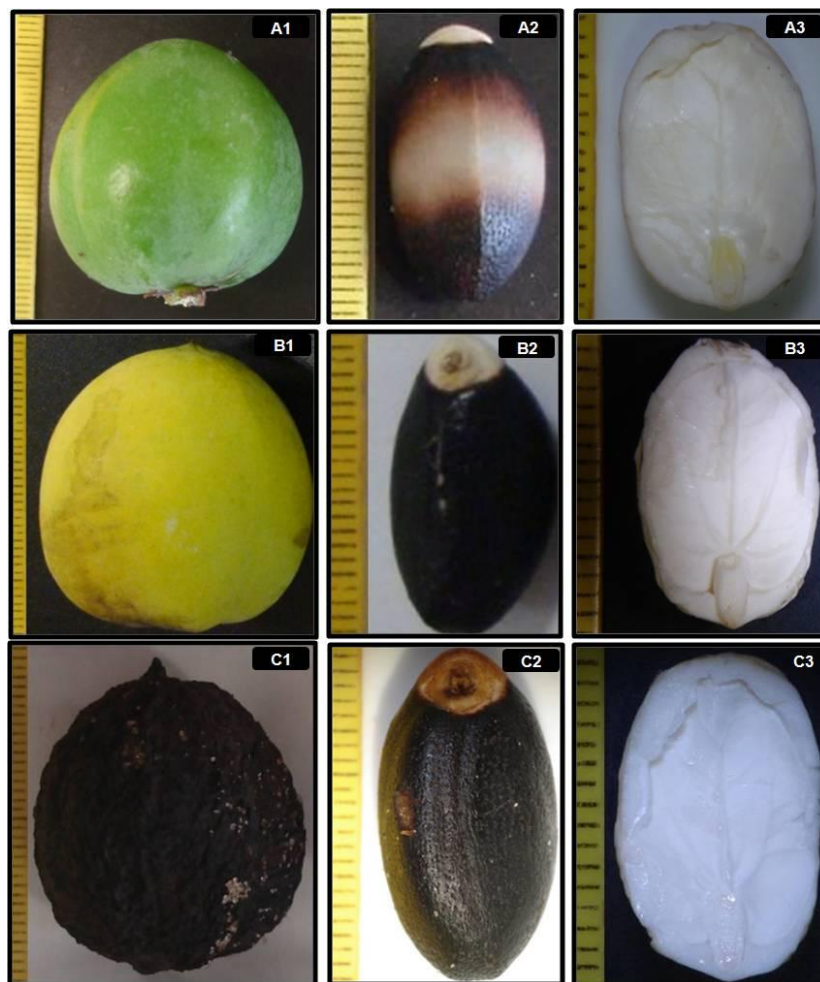
**Figura 9:** Caracterização morfológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento, aos 25 (A), 30 (B) e 35 (C) DAA. **25 DAA:** A1. fruto A2. Semente inteira, A3. Semente sem testa, A4. porção interna da semente, detalhe do endosperma e do integumento, A5. embrião. **30 DAA:** B1. fruto B2. Semente inteira, B3. Semente sem testa, B4. porção interna da semente, predomínio de endosperma, B5. porção interna da semente, endosperma e embrião. **35 DAA:** C1. fruto C2. Semente inteira, C3. Semente sem testa, C4. Semente sem a testa e exotégma. C5. porção interna da semente, endosperma e embrião.

O eixo embrionário juntamente com o endosperma que o rodeia, ocupam quase que completamente o interior da semente aos 40, 45 e 50 DAA, como mostra a **Figura 10 (A3, B3 e C3)**, respectivamente) restando apenas uma fina película membranosa de integumento interno.

O fruto com **40DAA** apresenta 3,1cm de comprimento e 2,93 cm de diâmetro (**Figura 10 A1**). A testa das sementes apresenta o tegumento externo com a seguinte característica: branco translúcido na região mais central e coloração preta amarronzada se direcionando das extremidades para o centro (**Figura 10 A2**). Assim, como o tegumento interno, ele apresenta-se nesse estágio rígido e quebradiço. As sementes apresentam a seguintes dimensões 2,05 cm de comprimento; 1,2 cm de largura e 0,94 cm de espessura (**Figura 6**); as médias das massas fresca e seca foram de 1,23g e 0,46g, respectivamente (**Figura 7**).

Com **45 DAA**, o fruto apresenta 3,02 cm de comprimento e 2,87 cm de diâmetro, sua coloração passa de verde a amarela (**Figura 10 B1**). As sementes apresentaram testa com tegumentos externo e interno totalmente escurecidos, rígido e quebradiço (**Figura 10 B2**). A maioria dos frutos passa a adquirir coloração amarelo – esverdeado (**Figura 10 B1**). As sementes apresentam a seguintes dimensões 2,01 cm de comprimento; 1,27 cm de largura e 0,92 cm de espessura (**Figura 6**); as médias das massas fresca e seca foram de 1,11g e 0,54g, respectivamente (**Figura 7**).

As sementes com **50** dias após a antese apresentam-se maduras, a carúncula, nesse estágio, se torna mais escurecida, e menos carnosa (**Figura 10 C2**). A semente tem suas dimensões e massa fresca diminuídas e ficam abrigadas nos frutos maduros, com coloração preta – amarronzado, com 2,61 cm de comprimento e 2,3 cm de diâmetro (**Figura 10 C1**). As dimensões apresentadas pelas sementes foram 1,86 cm de comprimento; 1,16 cm de largura e 0,9 cm de espessura (**Figura 6**); as médias das massas fresca e seca foram de 0,6g e 0,51, respectivamente (**Figura 7**)



**Figura 10:** Caracterização morfológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento, aos 40 (A), 45 (B) e 50 (C) DAA. **40 DAA:** A1. Fruto. A2. semente inteira. A3. porção interna da semente, endosperma e embrião. **45 DAA:** B1. fruto. B2. semente inteira. B3. porção interna da semente, endosperma e embrião. **50 DAA:** C1. Fruto. C2. Semente inteira, C3. porção interna da semente, endosperma e embrião.

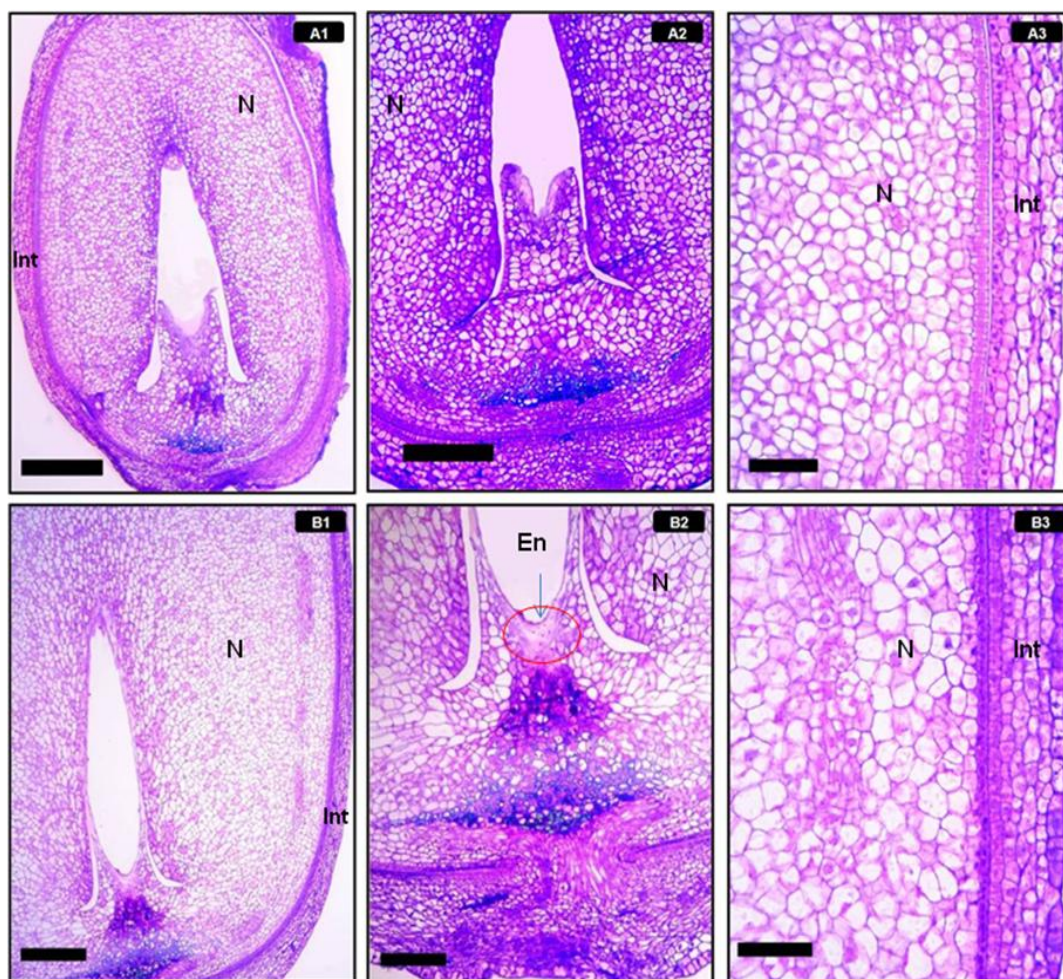
#### **4.1.4. Análises histológicas da deposição de reservas durante o desenvolvimento de sementes de pinhão manso**

Análises histológicas foram realizadas buscando – se ter uma maior informação a respeito de como ocorre o desenvolvimento da semente de pinhão manso, tendo como foco principal o estabelecimento da fase em que se inicia a deposição de reservas lipídicas e protéicas no endosperma, bem como a obtenção de informações que permitam determinar o padrão de deposição destas reservas no endosperma.

As análises histológicas mostraram que semente de pinhão manso com **5DAA**, apresenta – se composta basicamente pelos integumentos interno e externo, tecidos de origem materna (**Figura 11 A1 e A2**). O integumento, que reveste a semente apresenta, aproximadamente, seis camadas de célula (**Figura 11 A3**).

Aos **10 DAA** pode-se notar que os integumentos continuam ocupando a maior parte da semente (**Figura 11 B1 e B3**). As primeiras células do endosperma começam a ser observadas, como mostra a **Figura 11 B2**. A formação do endosperma celular parece se iniciar na porção onde o embrião se origina, no pólo micropilar, sendo ele circundado pelo integumento interno.

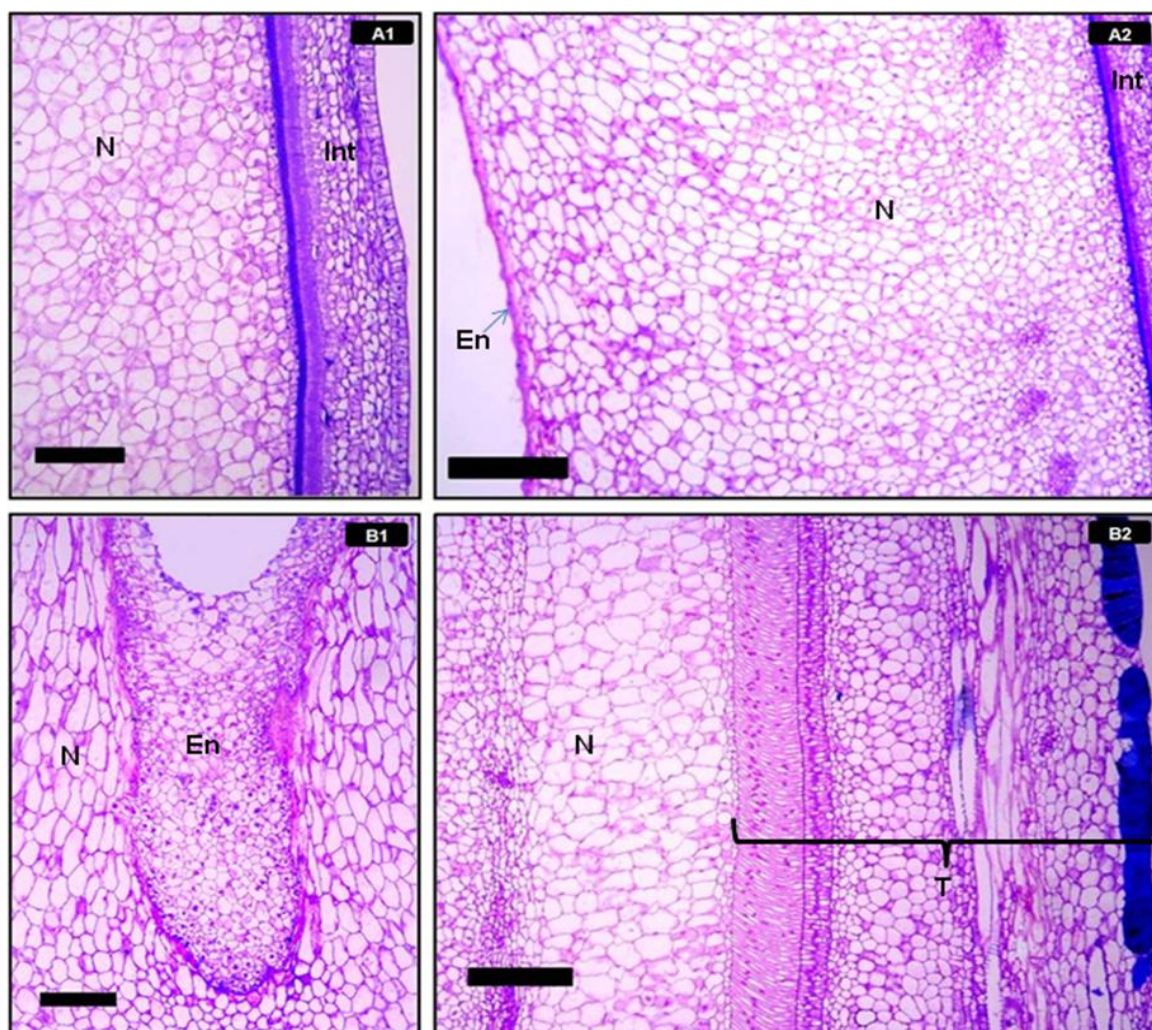




**Figura 11:** Análise histológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento aos 5 DAA (A), 10DAA (B). **5DAA:** A1. semente composta basicamente pelos integumentos. A2. células do integumento em aumento maior. A3. Detalhe dos integumentos interno e externo. **10 DAA** B1. semente composta basicamente pelos integumentos. B2. detalhe das primeiras células do endosperma em formação. B3. detalhe dos integumentos interno e externo. N: integumento interno, Int: integumento externo, En: endosperma. **Barras: primeira, segunda e terceira coluna: 0,2; 0,1; e 0,05mm, respectivamente.**

Com **15 DAA** o integumento externo da semente mostra-se em início de diferenciação, no qual se observa um aumento no número de camadas de células que o compõe, bem como uma coloração mais intensa da camada mais interna que o forma (**Figura 12 A1**). Nesse estágio a presença do endosperma ainda é quase irrisória, entretanto, pode-se observar novas células se formando em direção ao pólo oposto ao de inserção do embrião, enquanto o integumento interno continua perfazendo grande parte da semente (**Figura 12 A2**).

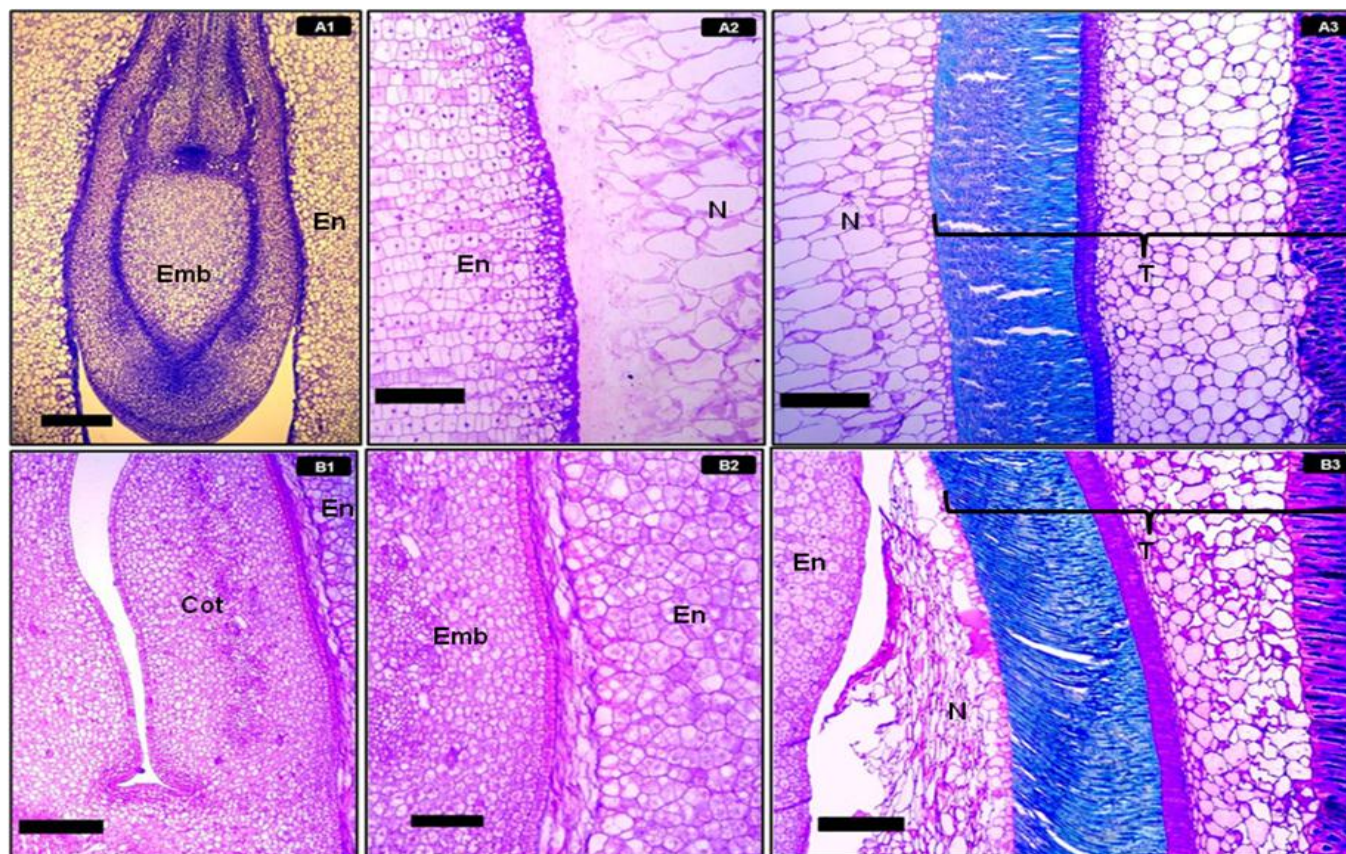
Com **20 DAA** o endosperma apresenta-se mais expandido, apresentando um grau de preenchimento considerável na região onde o embrião está inserido, com um aumento concomitante no número de camadas de células que formam o endosperma em direção ao pólo oposto ao de inserção do eixo embrionário, entretanto o integumento interno parece estar se degenerando (**Figura 12 B1**). A exotegma torna-se esclerificada, e a testa inicia sua diferenciação (**Figura 12 B2**).



**Figura 12:** Análise histológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento aos 15 DAA (A); 20 DAA (B). **15 DAA:** A1. integumento da semente em início de diferenciação. A2. Células do endosperma se formando em direção ao pólo oposto ao de inserção do embrião. **20 DAA:** B1. preenchimento considerável do endosperma na região onde o embrião está inserido. B2. exotegma torna-se esclerificada, e a testa inicia sua diferenciação. N: integumento, T: testa + tegma, En: endosperma. **Barra: 0,1 mm em A1 e 0,2 mm em A2, B1 e B2.**

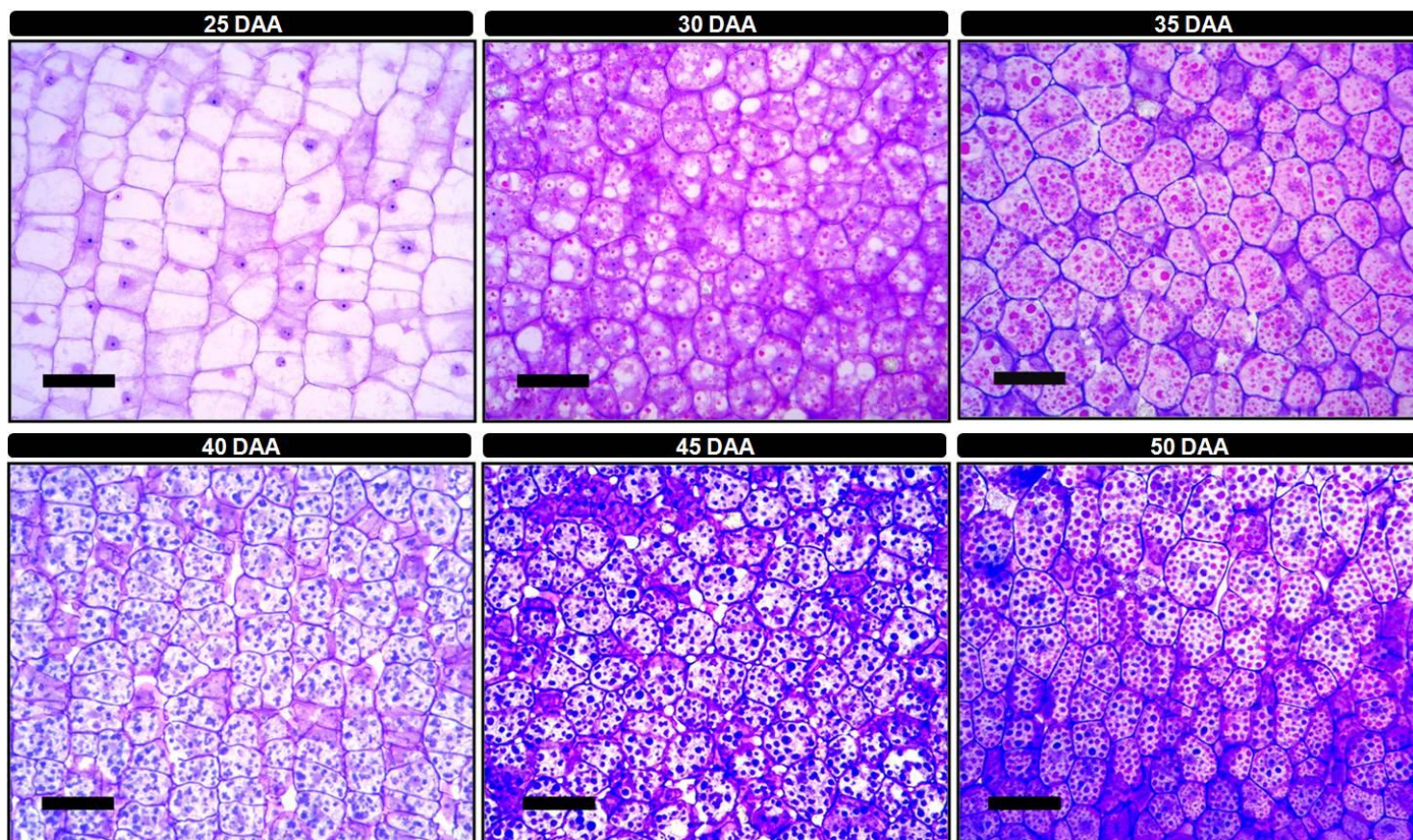
Durante as análises histológicas da semente de pinhão manso com **25 DAA**, pôde-se observar que o integumento interno, o qual de início ocupava a maior parte da semente, passa a ficar restrito, cada vez mais, a uma pequena porção, enquanto o endosperma encontra-se em contínua expansão (**Figura 13 A2**). Nesse estágio falta pouco para ele preencher completamente a região oposta à micrópila, embora já contorne inteiramente o embrião o qual se encontra em estágio cotiledonar (**Figura 13 A1**). A testa encontra-se progressivamente mais diferenciada (**Figura 13 A3**).

Aos **30 DAA** o endosperma ocupa todo o eixo apical basal (**Figura 13 B1 e B2**), sendo o integumento interno restrito a uma fina camada de células colapsadas (**Figura 13 B3**). Pode-se observar que nesse estágio as células do endosperma passam a apresentar substâncias depositadas dentro de vacúolos, possíveis material de reserva. O embrião encontra-se mais expandido.



**Figura 13:** Análise histológica de sementes de pinhão manso em desenvolvimento aos 25 DAA (A); 30 DAA (B). **25 DAA:** A1. embrião se encontra em estágio cotiledonar. A2. Detalhe do integumento interno, e endosperma. A3. Testa e exotegma diferenciados. **30 DAA:** B1. embrião mais expandido. B2. Detalhe das células do endosperma e embrião. B3. Detalhe da casca, integumento interno e endosperma. N: integumento interno, T: testa + exotegma, En: endosperma, Emb: embrião, Cot: cotilédone. **Barra: 0,1mm em B2 e 0,2 mm nas demais.**

As análises histológicas mostraram que sementes com **35, 40, 45 e 50 DAA**, também apresentam substâncias depositadas dentro de vacúolos, possíveis material de reserva, das células do endosperma. Apesar de a análise histológica não fornecer dados quantitativos, é bastante perceptível o aumento progressivo na quantidade de substâncias depositadas dentro das células do endosperma com 35 DAA a 50 DAA (**Figura 14**)



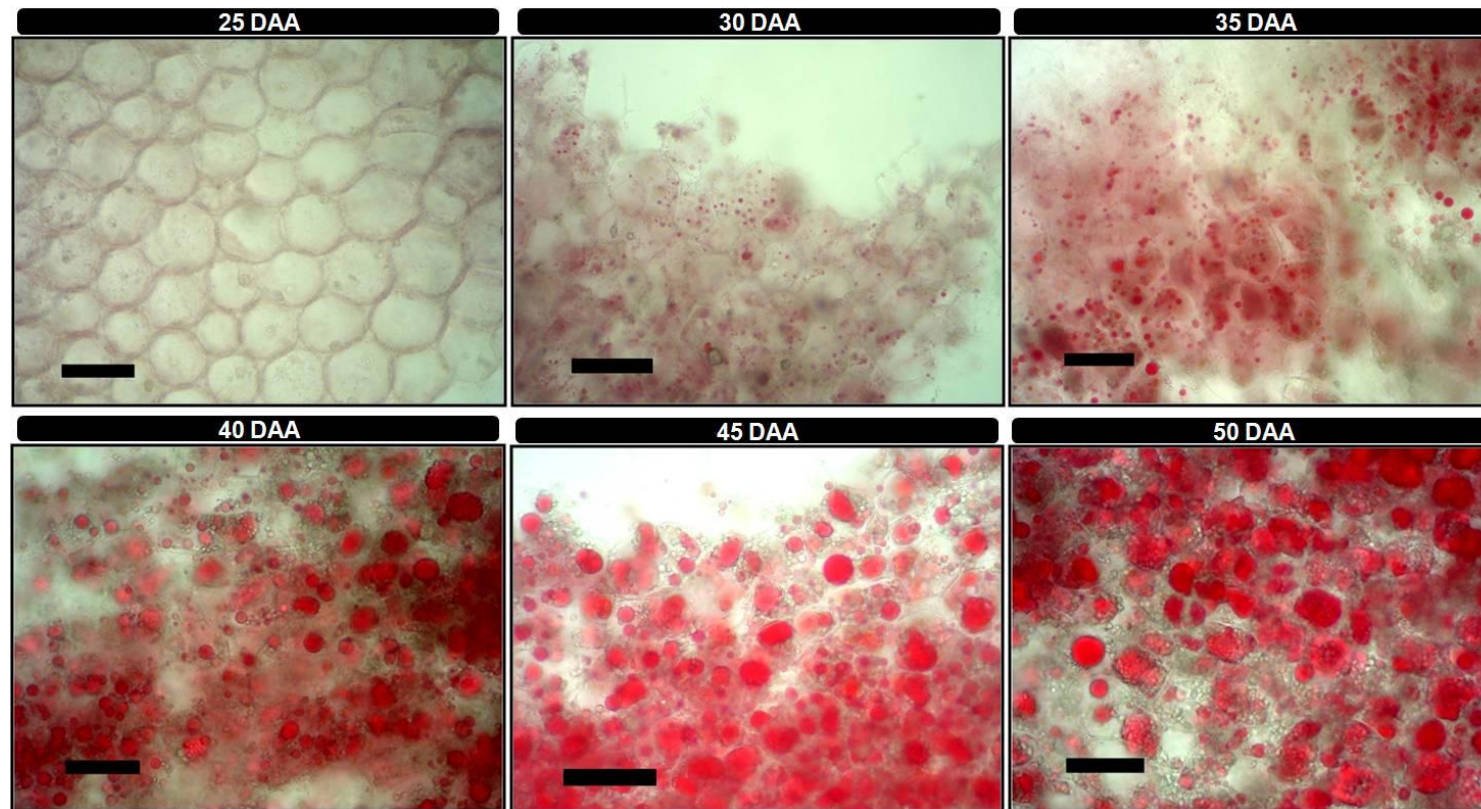
**Figura 14:** Análise histológica de células do endosperma de sementes de pinhão manso com 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA. A partir dos 30 DAA é possível observa substâncias de reserva depositadas nas células do endosperma **Barra: 0,05mm.**

#### **4.1.5. Análise histoquímica da deposição de lipídios e proteínas em sementes em desenvolvimento de pinhão manso**

Os testes histoquímicos para lipídios e proteínas utilizando-se Sudan IV e Xylidine Ponceau, respectivamente, foram realizados em endosperma de sementes em desenvolvimento a partir de 25 DAA, estágio em que o endosperma em formação já é bastante perceptível, prosseguindo até os 50 DAA.

Com **25 DAA** o teste histoquímico apresentou resultado negativo para lipídio. Já para endosperma de sementes com **30, 35, 40, 45 e 50 DAA**, observou-se coloração avermelhada em estruturas celulares, o que indica resultado positivo para lipídios em presença de Sudan IV (**Figura 15**).

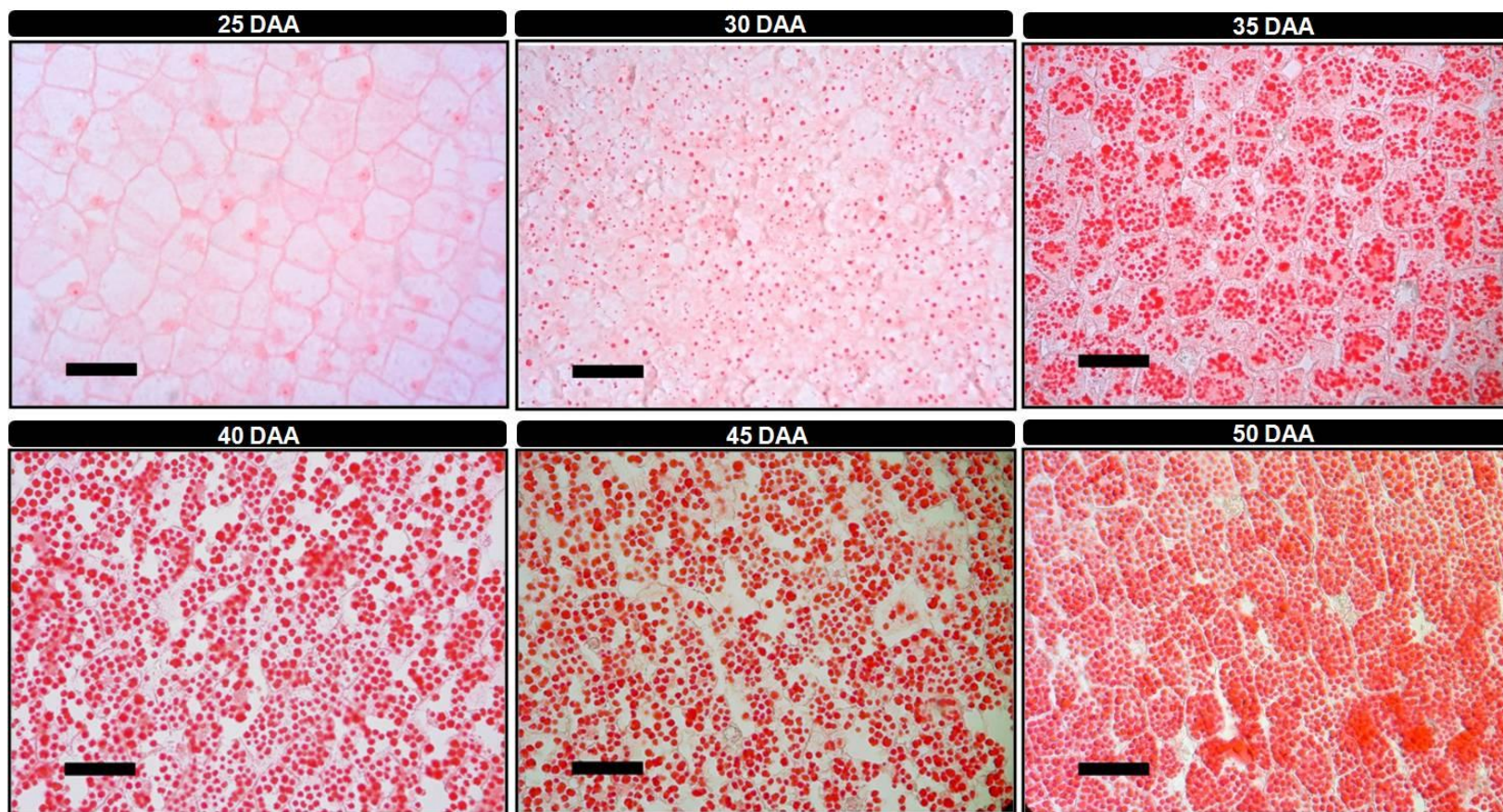




**Figura 15:** Análise histoquímica com Sudan IV, específica para lipídios, de células do endosperma de sementes de pinhão manso com 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA. Aos 30 DAA é possível observar o início da deposição de lipídios nas células do endosperma. **Barra: 0,05mm**

Através da análise do teste histoquímico para proteína foi possível observar que a deposição de proteínas não precede nem antecede a deposição de lipídios, a deposição de ambos se inicia no mesmo estágio aos **30 DAA (Figura 16)**.

Embora a análise histoquímica não seja um método aplicado para análise quantitativa e sim qualitativa, foi observado um aparente aumento progressivo na quantidade de proteínas e lipídios dentro das células do endosperma de **35 DAA** até **45 DAA** devido ao aumento da quantidade e da intensidade da coloração específica (**Figura 15 e 16**).



**Figura 16:** Análise histoquímica com *Xylidine Ponceau*, específica para proteínas, de células do endosperma de sementes de pinhão manso com 25, 30, 35, 40, 45 e 50 DAA. Aos 30 DAA é possível observar o início da deposição de proteínas nas células do endosperma. **Barra: 0,05mm**

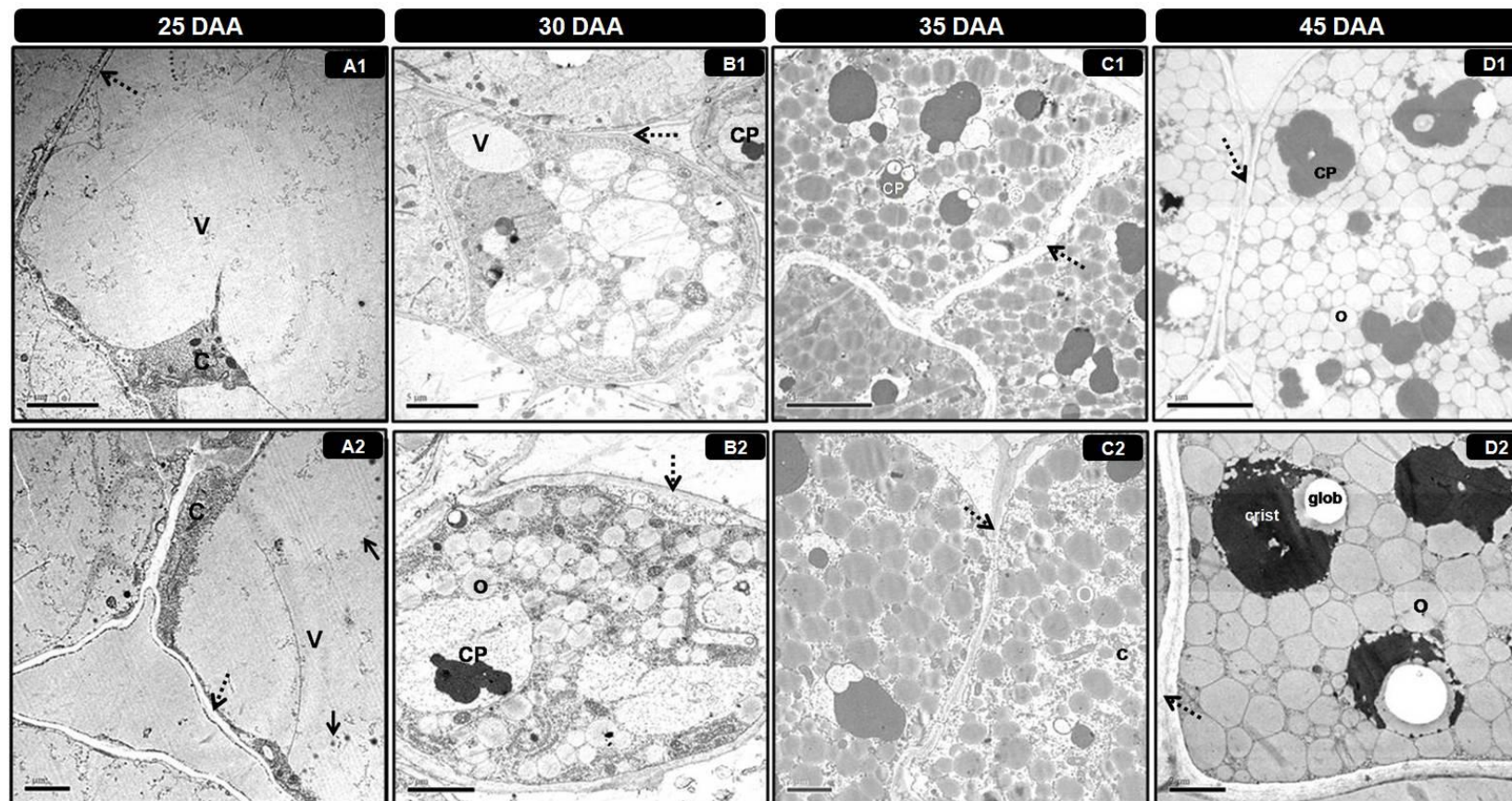
#### **4.1.6. Análise por microscopia de transmissão (MET) de sementes em desenvolvimento de pinhão manso**

Na análise de MET das células do endosperma das sementes em desenvolvimento, pode-se observar que aos **25 DAA (Figura 17 A1 e A2)**, as células apresentam conteúdo citoplasmático limitado a uma pequena porção, se restringindo a periferia da célula, apresentando-se rica em retículo endoplasmático rugoso. Enquanto o vacúolo é bastante grande, ocupando a maior parte da célula. Nesse estágio ainda não é observada deposição de reserva, entretanto pode-se observar o início da formação de vacúolos onde se depositarão os corpos protéicos.

Com **30 DAA** a proporção da região que o vacúolo ocupa na célula diminui consideravelmente, e o conteúdo citoplasmático alcança maiores proporções, se expandindo e se distribuindo pela célula. A deposição de reservas protéica e de lipídios pode ser observada, estes dentro de oleossomos, embora ainda não intumescido (**Figura 17B1 e B2**).

Observando-se a **Figura 17 C1 e C2**, pode-se perceber que aos **35 DAA** o material de reserva depositado na forma de proteína e lipídios atinge proporções consideráveis, limitando a visualização das demais organelas. Nesse estágio os oleossomos apresentam-se intumescido. Massa fundamental, cristalóide e globóide, estruturas típicas presentes nos corpos protéicos, podem ser observadas.

Análise por MET também foram realizadas em células de endosperma de sementes com **45 DAA**, os resultados obtidos se assemelharam bastante aos observados nas amostras de endosperma com **35 DAA**. Entretanto nesse estágio foi possível a visualização de praticamente somente de oleossomos corpos protéicos e parede celular, devido às proporções que estes ocupam na célula, impedindo a visualização das demais organelas. (**Figura 17 D1 e D2**).



**Figura 17:** Imagens por MET de células do endosperma de sementes de pinhão manso com 25, 30, 35 e 45 DAA. V: vacúolo, C: citoplasma, setas preenchidas: início da formação do vacúolo protéico, setas pontilhadas: parede celular, CP: corpo protéico, O: oleossomo, Cris: cristalóide, glob: globóide. Barra: 5µm (A1,B1,C1,D1) e 2µm (A2,B2,C2,D2).

O acompanhamento do desenvolvimento das sementes é feito com base nas modificações que ocorrem em algumas características físicas e fisiológicas, como tamanho, teor de água, conteúdo de matéria seca acumulada e coloração da semente.

Após a fertilização, o tamanho da semente aumenta rapidamente, atingindo o máximo em curto período de tempo em relação à duração total do período de maturação. Este rápido crescimento é devido à multiplicação e ao desenvolvimento das células do embrião e do tecido de reserva (DUMA e ROGOWSKY,2008). Após atingir o máximo, o tamanho vai diminuindo devido à perda de água pelas sementes e esta redução é variável com a espécie; em soja, por exemplo, é acentuada, enquanto que em milho é bem pequena. Em *Jatropha curcas* foi observado que essa perda de tamanho é bastante tênue (**Figura 6**).

Paralelamente, os produtos formados nas folhas, pela fotossíntese, são encaminhados para a semente em formação, onde são transformados e aproveitados para a formação de novas células, tecidos e como futuro material de reserva. O floema termina na casca, onde ocorre o descarregamento dos solutos, sacarose, por exemplo. Os solutos então se movem através do apoplasto até o saco embrionário e são reabsorvidos pelas células do endosperma, caracterizando a rota de assimilados a partir da casca da semente durante seu desenvolvimento (THORNE, 1981). Água e solutos são transportados para a semente através do floema. O descarregamento do floema ocorre através da testa e os solutos são então transportados para o embrião (ou endosperma) através do apoplasto. (BRADFORD, 1994).

Os resultados observados durante a determinação da curva de massa fresca (**Figura 7**) mostram que inicialmente ocorre um aumento linear inicial até certo ponto, tal fato ocorre devido à intensa divisão celular e formação do embrião (histodiferenciação); em seguida ela prossegue com a expansão celular acompanhada da fase de deposição de reserva e maturação da semente, em que após o ganho de massa fresca mantém-se constante até se iniciar a fase de dessecação, na qual a semente sofre desidratação e conseqüentemente perde peso, como mostra a parte final da curva, na qual se observa um decréscimo linear a partir dos 45DAA. Esses dados estão de acordo com as fases pelas quais, segundo Thaker (1999), as sementes de angiospermas em desenvolvimento passam, que são: histodiferenciação, expansão celular acompanhada de acúmulo de reservas, e a fase final, que corresponde ao dessecação.

A matéria seca da semente são as proteínas, açúcares, lipídios e outras substâncias que são acumuladas nas sementes durante o seu desenvolvimento. Logo após a fertilização, o acúmulo de matéria seca se processa de maneira lenta, pois as divisões celulares predominam, ou seja, está ocorrendo um aumento expressivo no número de

células. Em seguida, verifica-se um aumento contínuo e rápido na matéria seca, como pode ser observado na figura 2, a partir dos 25DAA, até atingir o máximo, aos 45 DAA. Segundo Silva *et. al.* (2001), em geral, a semente deve atingir a sua máxima qualidade fisiológica quando o conteúdo de matéria seca for máximo. Segundo os mesmos, durante esta fase de intenso acúmulo de matéria seca, o teor de água da semente permanece alto, devido à água ser o veículo responsável pela translocação do material fotossintetizado da planta para a semente o que justifica os dados obtidos de massa fresca da semente se manter em altos valores nos estágios iniciais de deposição de lipídios e proteínas dos 30 aos 40 DAA. Além disso, para que o material que chega à semente seja metabolizado, é necessário que o meio, onde estão ocorrendo as reações, seja bastante aquoso. Portanto, durante esta fase é primordial que haja adequada disponibilidade de água e de nutrientes no solo para que o preenchimento das sementes seja satisfatório (THORNE, 1981).

Segundo Vicente-Carbajosa e Carbonero (2005), muitos estudos feitos com maturação de sementes de diversas espécies apontam o ponto de máximo conteúdo de matéria seca como o melhor e mais seguro indicativo de que as sementes atingiram a maturidade fisiológica. Dessa forma a maturidade fisiológica fica caracterizada como aquele ponto após o qual a semente não recebe mais nutrientes da planta mãe, cessando a conexão planta-semente. A partir daí, a semente permanece ligada à planta apenas fisicamente.

As análises histoquímicas mostraram que a deposição de lipídios, nas células do endosperma de sementes de *J. curcas*, se inicia aos 30 DAA (**Figura 15**), entretanto Annarao, *et. al.* (2008), a partir de estudos do perfil de lipídios em sementes de *J. curcas* em diferentes estágios do desenvolvimento, utilizando espectroscopia por ressonância nuclear magnética, observaram que a síntese de lipídios em *J. curcas* já podia ser registrada próximo a terceira semana após a fertilização. Tal evento sugere que, devido à espectroscopia por ressonância nuclear magnética ser uma ferramenta de análise de maior acurácia, quando comparada à análise por histoquímica, lipídios em quantidades bastante pequenas, em estágios que antecedem os 30 DAA, podem não ter sido detectados pela técnica utilizada no presente trabalho. Não se pode também deixar de levar em consideração o fato de que o presente trabalho utilizou apenas o endosperma como tecido durante as análises histoquímicas, enquanto Annarao, *et. al.* (2008) fez uso da semente inteira. Segundo Raju e Ezradanam (2002) os estigmas são receptivos após a abertura das flores e assim permanece por três dias, esse fato pode interferir na determinação exata da idade da semente em determinado estágio do desenvolvimento, podendo, dessa forma, ocorrer uma pequena variação na determinação da idade por até três dias, e

conseqüentemente, poder ser mais um fator que pode estar atuando na diferença do período de início da síntese de lipídios.

O trabalho de Annarao, *et. al.* (2008) também mostrou que a concentração de ácidos graxos livres apresenta maior percentual de contribuição acerca do total de lipídios nos estágios iniciais do desenvolvimento da semente, em seguida, os lipídios na forma de triacilglicerol passam a ocupar crescentemente a maior porcentagem nos estágios de maturação da semente.

As análises histoquímicas para proteínas mostraram que o armazenamento de proteínas também se inicia aos 30 DAA (**Figura 16**) e é perceptível que há um aumento crescente com o decorrer do desenvolvimento da semente. Estudos a respeito dos produtos de acúmulo de reservas e do padrão de expressão gênica realizados por Hills (2004) com sementes de *Arabidopsis* em desenvolvimento, mostraram que os picos de expressão de genes que estão envolvidos no metabolismo de carboidratos são os primeiros a serem expressos; os que são necessários para a síntese de óleo são expressos posteriormente, e por último são expressos os genes relacionados com a produção de corpos protéico e oleosomos.

Imagens obtidas em microscópico de transmissão mostram-se em congruência com os dados obtidos pela histoquímica, além de proporcionarem informações adicionais. A partir das análises por MET (**Figura 17**), pode-se observar que as proteínas de reserva ficam depositadas em vacúolos modificados denominado de corpos protéicos, assim como também pode ser observado por Hills (2004), ao fazer análise por MET de células de embriões em desenvolvimento.

A partir das imagens de MET de sementes em desenvolvimento obtidas no presente trabalho, foi possível fazer a visualização de três componentes formando o corpo protéico: a massa fundamental, o cristalóide e o globóide, como podem ser visualizados na **figura 17C e 17D**, aos 35DAA e 45 DAA. Segundo Youle e Huang (1976), o corpo protéico possui uma matriz protéica amorfa, e em muitas leguminosas, essas organelas também podem possuir inclusões de globóides de fitina. Em sementes de mamona, os corpos protéicos possuem uma inclusão extra de cristalóides de proteínas em adição aos globóides de fitina (hexafosfato de inositol). Nessas sementes a fitina é restrita ao globóide da organela. Os cristalóides são compostos por proteínas de reserva do tipo globulina.

As análises histológicas mostraram que à medida que a semente se desenvolve o endosperma vai atingido maiores proporções da semente enquanto o integumento interno ao final do desenvolvimento se restringe a uma camada irrisória, como já pode ser



percebido na **Figura 13 B3**. O mecanismo que pode estar contribuindo para a expansão do endosperma durante o desenvolvimento da semente é a morte celular programada que ocorre nas células de origem materna: o nucelo e o integumento. Wang e Gilchrist (1996) relataram que com a expansão do endosperma celular em sementes de *Ricinus* em desenvolvimento, os núcleos, das camadas de células do nucelo próximas à face em expansão do endosperma em desenvolvimento, exibem fragmentação do DNA, sugerindo que as células estão sofrendo morte celular programada. Apesar da fragmentação nuclear do DNA não ser um critério suficiente que comprove que está havendo morte celular programada por apoptose, características morfológicas e ultraestruturais consistentes com a progressão da morte celular programada foram verificadas nas células do nucelo (GUNAWARDENA *et. al.*, 2001). Essas incluem mudanças na densidade do tonoplasto, formação de vesículas no citoplasma, deformação do núcleo e organelas, condensação da cromatina nuclear, colapso e condensação do citoplasma, e colapso celular. Vários autores (LAM e GREENBERG, 2000; BEWLEY e BLACK, 1994; GREENWOOD e BEWLEY, 1982; SIMCOX *et. al.* 1979; GREENWOOD *et.al.* 1984; GREENWOOD e BEWLEY, 1985) relataram que o processo de morte celular programada tem levado a destruição do nucelo e do integumentos durante o desenvolvimento da semente em vários outros sistemas.

Greenwood *et.al.* (2005), relataram que as células da primeira camada de células do endosperma adjacentes à paredes celulares do apoplasto em colapso apresentam estrutura de transferência celular. Essas são caracterizadas por invaginações na parede, que aumentam substancialmente a área de superfície da membrana plasmática. Essas invaginações são limitadas à parte da parede celular das células do endosperma que fazem fronteira com a camada de células em colapso, as outras partes de suas paredes celulares são conectadas com as células vizinhas apenas por plasmodesmos, ocorrendo dessa forma transporte simplástico dos solutos e nutrientes. Plasmodesmos parece ser a via primária ou única de transporte de solutos e nutrientes entre as células em desenvolvimento em sementes de *Ricinus*.

As células de transferência do endosperma de *Ricinus*, certamente estão envolvidas na captura de catabólitos provenientes do das células mortas do nucelo e dos integumentos durante os estágios iniciais do endosperma em expansão (GREENWOOD *et.al.*, 2005).

Uma extensa vascularização foi observada durante as análises histológicas das sementes de *J. curcas* em desenvolvimento, com entrada a partir do pólo calazal, sendo esta também verificada no óvulo e na semente em desenvolvimento de *Ricinus*, como relata Greenwood e Bewley, (1982), com entrada no pólo calazal ramificando-se nos tecidos maternos para cercar o saco embrionário. Segundo esses autores, a vascularização

permanece ativa após a destruição do nucelo e do integumento. Ela fornece os metabólitos que permitem um aumento de 25 vezes em relação ao peso seco do endosperma nos últimos dois terços do desenvolvimento, após a destruição do nucelo (GREENWOOD *et. al.*, 1984).

Como o presente trabalho tem no endosperma seu maior foco, se torna interessante fazer algumas considerações a mais sobre o mesmo.

O desenvolvimento do endosperma se inicia com a fertilização da célula central. No endosperma nuclear, os núcleos iniciais do endosperma se dividem repetidamente, sem a formação de parede celular, resultando em um endosperma cenocítico, no qual o núcleo se distribui pela periferia de uma imensa célula, circundando um vacúolo central. (BOISNARD-LORIG, *et. al.*, 2001).

O processo de celularização se inicia no ciclo final da mitose cenocítica, a partir do endosperma micropilar, prosseguindo para o endosperma calazal (BROWN *et. al.*, 1999). Esse mesmo padrão de celularização pode ser observado durante o desenvolvimento das sementes de *J. curcas* durante os experimentos de histologia (Figuras 11.B2, 12.A2 e 12. B1) .

Durante o processo de desenvolvimento da semente uma série de fatores atua para que ele ocorra corretamente e a semente cresça. Segundo Berger *et. al.* (2006), durante o crescimento da semente é necessário que ocorra uma coordenação entre o embrião, o endosperma, e os tecidos de origem materna, os integumentos da semente e o nucelo. Estudos recentes demonstram que uma ação combinada entre o crescimento do endosperma e integumento é essencial para a determinação do tamanho da semente em *Arabidopsis* (GUITTON *et. al.*, 2004).

Mutações no gene *HAIKU* (*IKU*) diminuem o tamanho do endosperma e eventualmente o tamanho da semente e do embrião (GARCIA *et. al.* 2003). Os genes *HAIKU: IKU2* e *MINISEED3 (MINI3)* codificam uma quinase repetida rica em leucina e um fator de transcrição *WRKY*, respectivamente (LUO *et. al.* 2005). Esses genes são expressos no endosperma imediatamente após a fertilização. A diminuição no tamanho do endosperma em mutantes *iku* é acompanhada pelo decréscimo no alongamento celular do integumento da semente, indicando comunicação entre esses dois componentes distintos geneticamente (GARCIA *et. al.* 2005). Similarmente, a redução no grau de alongamento celular no integumento da semente reduz o crescimento do endosperma. Inversamente, aumentando o número de células no integumento da semente leva a um aumento simétrico no crescimento do endosperma (CANALES *et. al.* 2002, SCHRUFF *et. al.* 2006).

Em *Arabidopsis*, o tamanho final da semente é determinado antes de o embrião iniciar a maior fase de proliferação celular após o estágio cordiforme. Esses resultados mostram a capacidade dos integumentos das sementes em regular o crescimento do endosperma por um efeito esporofítico materno. Em espécies de cereais, o embrião permanece confinado a um pequeno volume na semente madura e o endosperma estende seu desenvolvimento até a maturação da semente e armazenamento das reservas. Dessa forma, o modelo de controle de tamanho da semente estabelecido em *Arabidopsis* é provável que seja aplicado aos cereais (BERGER *et. al.*, 2006), bem como à *Jatropha curcas*, como observado no presente trabalho. A natureza do mecanismo de comunicação entre endosperma e integumentos permanece desconhecida. Um provável fator poderia ser forças biofísicas; o endosperma em crescimento poderia exercer tensões mecânicas nas células do integumento (HAUGHN e CHAUDHURY, 2005).

## 4.2. Isolamento de plastídios de sementes em desenvolvimento de pinhão manso

O processo de isolamento de plastídios ocorreu através de uma série de centrifugações, dentre as quais o passo de centrifugação em gradiente descontínuo de PBF-Percoll, foi fundamental para a obtenção de uma fração rica em plastídios localizada na interface das camadas de 35-22% do gradiente de PBF-Percoll (Figura 18).

Durante o processo de isolamento de plastídios três frações foram obtidas denominadas de:

FRAÇÃO I: precipitado obtido após a centrifugação a 200g por 10 minutos, do filtrado do homogeneizado (Figura 5 AI);

FRAÇÃO II: precipitado obtido após a centrifugação do primeiro sobrenadante: 6000g por 15 minutos (Figura 5 AII);

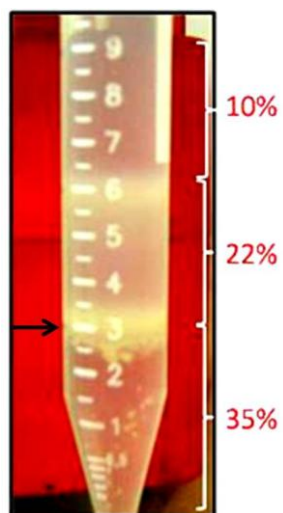
FRAÇÃO III: precipitado obtido após a centrifugação a 1000g por 10 minutos, da fração da interface 33-22% do gradiente de PBF-Percoll, diluída em tampão de homogeneização (Figura 5 AIII).

Para avaliar o grau de pureza e se ter uma noção da composição em organelas de cada fração, as frações I, II e III foram examinadas através da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia eletrônica de transmissão.

### 4.2.1. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é capaz de produzir imagens de alta resolução, entretanto ele proporciona apenas visualização da superfície de uma amostra. Dessa forma, a análise por microscopia de varredura forneceu pouca informação quanto à composição em organelas e grau de pureza das frações I, II e III.

Esta análise mostrou que à medida que ocorre uma nova centrifugação, as frações obtidas apresentam um aspecto mais homogêneo. Na fração I foi observada a presença de organelas de tamanhos diversificados, bem como de um presumível material celular lisado sobre as mesmas, correspondendo possivelmente a restos celulares e fragmentos de tecidos. (**Figura 19. A1**). Na fração II as organelas apresentaram um tamanho mais homogêneo. Como ela foi obtida a partir de um sobrenadante, um menor grau de deposição de possíveis lisados celulares foi observado (**Figura 19. A2**). Por fim, a fração III, mostrou-se com o aspecto mais homogêneo com relação à forma e tamanho das estruturas observadas (**Figura 19. A3**).



**Figura 18:** Fração enriquecida em plastídios obtida através centrifugação de uma fração enriquecida em organelas em um gradiente descontínuo de PBF-Percoll. A seta indica a fração enriquecida em plastídios na interface entre as camadas 35 e 22% de PBF- Percoll

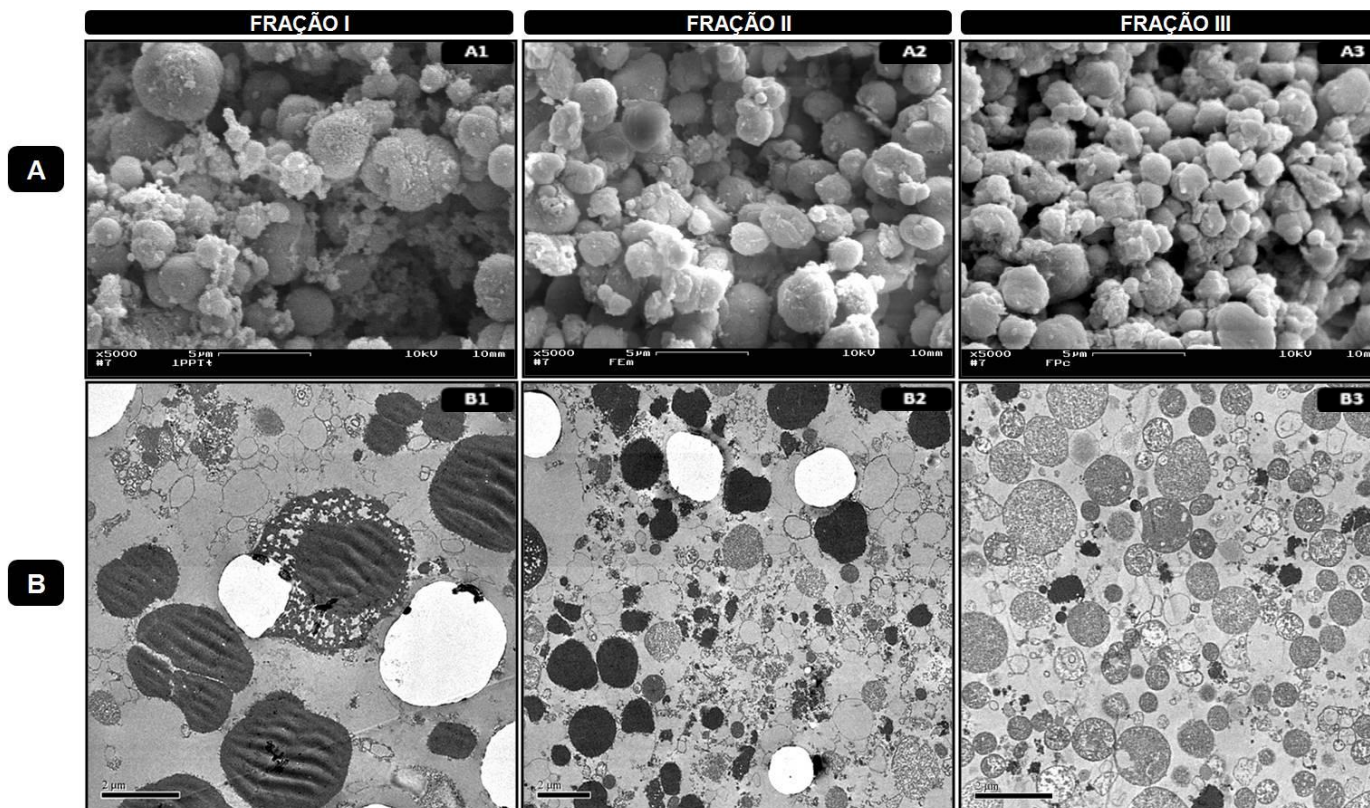
#### 4.2.2. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão é utilizado para a observação de cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos permitem que diversas camadas da amostra sejam visualizadas, permitindo a análise da fase interna de estruturas. No caso da análise de um tecido, por exemplo, esses cortes proporcionarão a visualização das células bem como das organelas que fazem parte das mesmas.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitiu, dessa forma, uma análise da fase interna das estruturas presentes na fração I, II e III, possibilitando uma investigação mais acurada dessas três frações.

A análise por MET da fração I (**Figura 19. B1**) proporcionou a visualização de uma grande quantidade de corpos protéicos e oleossomos, como também de uma variedade de outros componentes como restos celulares e fragmentos do endosperma, muitos deles aparentemente com ruptura de membrana. Na análise por MET da fração II foi possível observar a presença de várias organelas diferentes, algumas delas danificadas. Oleossomos, plastídios e mitocôndrias foram possíveis de serem identificados, contudo, não foi observada a presença de corpos protéicos. Essa fração foi então denominada de fração enriquecida de organelas (**Figura 19. B2**).

Na análise por MET da fração III foi possível observar, de forma mais nítida, que a fração localizada da interface das camadas de 35 e 22% do gradiente de PBF-Percoll é composta na sua maioria por único tipo de organela, apresentando um alto padrão de homogeneidade. Segundo Miernyk *et. al.* (1989) os leucoplastos *in situ* são tipicamente ovóides, entretanto quando isolados sob condições isosmótica apresentam forma esférica com uma matriz granular uniforme, poucos plastoglobulos e sem membrana elaborada no estroma, ou seja, sem tilacóides, tais características se assemelham às observadas nessa fração (**Figura 19. B3**). Os plastídios observados na fração III apresentaram tamanhos variados, intactos na sua maioria. Essa fração foi, dessa forma, denominada de fração enriquecida de plastídios. Muito embora outras organelas como mitocôndrias tenham sido observadas, mesmo que em quantidade bem menor.



**Figura 19:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) das frações I, II e III. **A.** MEV das frações I, II e III. **B.** MET das frações I, II e III. Barra de 5μm em A e 2μm em B.

Embora trabalhos empregando gradiente de sacarose e de Nicodenz por Balmer *et. al.*, 2006, sejam utilizados para obtenção de fração enriquecida de plastídios, Mifflin e Beevers (1974) se mostraram insatisfeitos com os resultados obtidos ao fazer uso desta metodologia. Segundo os autores a mudança brusca das concentrações de sacarose levou à ruptura de uma quantidade considerável dos plastídios.

A utilização de gradiente descontínuo de Percoll é descrita na literatura como um método importante no isolamento de plastídios, essa técnica mostrou ser eficiente na separação dos leucoplastos, das frações citosólicas mitocondrial e peroxissomal, por Gupta e Singh (1996), Smith *et. al.* (1992), Negm *et. al.* (1995), Shearer *et. al.* (2004), Primavesi *et. al.* (2008) e Jain *et. al.* (2008).

O protocolo de isolamento de leucoplasto utilizado no presente trabalho baseou-se no proposto por Boyle *et. al.* (1986), com algumas modificações, e, assim como os acima relacionados, utiliza gradiente descontínuo de Percoll. Este protocolo mostrou-se eficiente na obtenção de uma fração enriquecida de leucoplastos, como mostrado nos resultados obtidos por MET (**Figura 17. B**). Muito embora os resultados obtidos através das análises de microscopia eletrônica indicar que a fração III é composta predominantemente de plastídios, outros parâmetros, tais como ensaios enzimáticos específicos para organelas individuais, deverão ser utilizados para aferir a homogeneidade desta fração.

As análises por microscopia eletrônica de varredura e transmissão forneceram indícios que a fração II é enriquecida com organelas tais como mitocôndrias, plastídios e oleossomos. As mesmas análises mostraram que a fração III é composta predominantemente de plastídios. Nós decidimos assim estabelecer mapas bidimensionais das proteínas presentes em ambas as frações.

### **4.3. Estabelecimento de mapas bidimensionais**

Após um melhor conhecimento, sobre o grau de pureza das frações I, II e III, proporcionado pelas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, mapas bidimensionais da fração II (fração enriquecida em organelas) e da fração III (fração enriquecida em plastídios) foram estabelecidos.

#### **4.3.1. Fração rica em organelas (Fração II)**

O método de extração de proteínas utilizado para a extração de proteínas das frações II e III foi o mesmo descrito por Vasconcelos *et. al.*, 2005, e a dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). Constatou-se através da

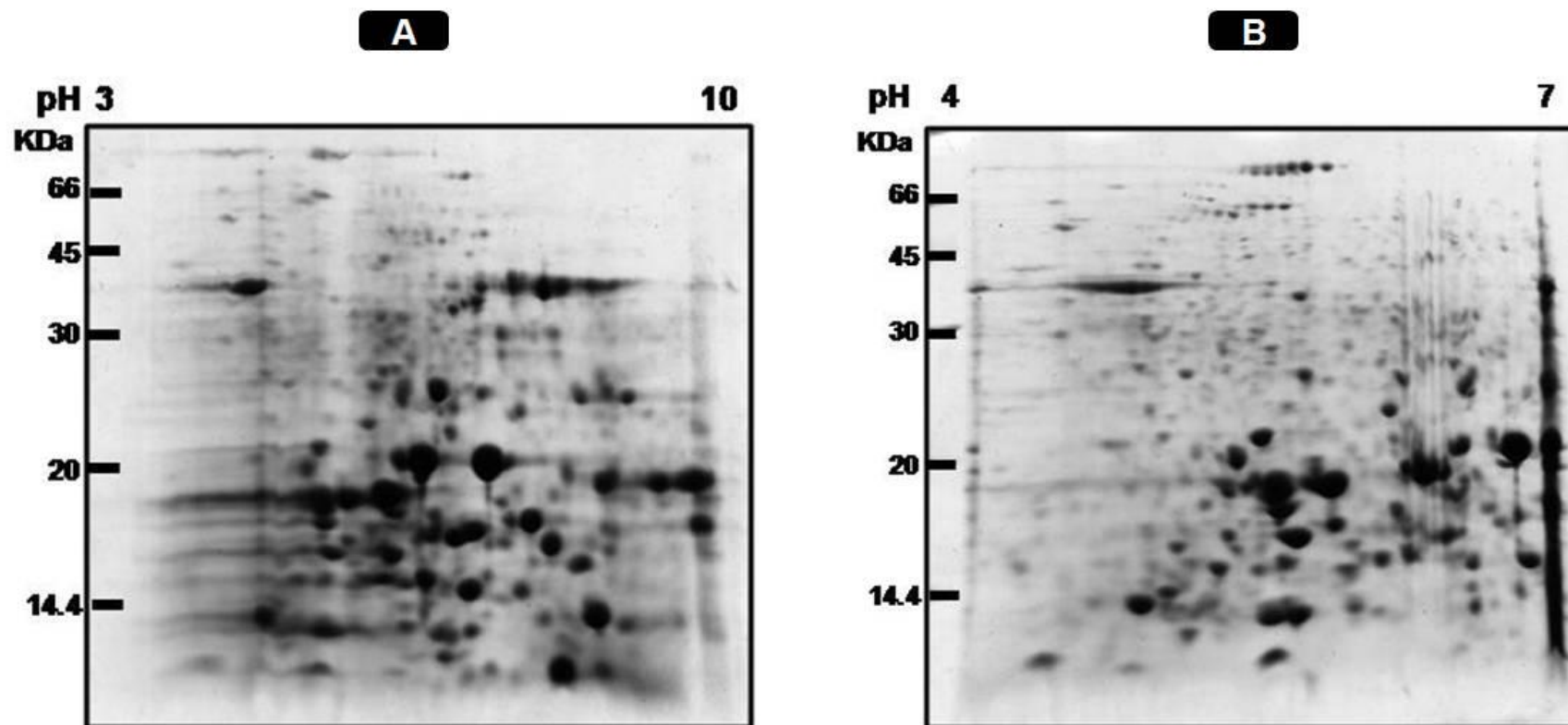


dosagem que a partir de 1g de endosperma (massa fresca), obtém - se 0,54 mg de proteína, da extração da fração enriquecida de organelas, e 25,2 µg, de proteína, da extração da fração enriquecida de plastídios.

Nos géis da fração enriquecida de organelas foram aplicados 500 µg de proteína, utilizando tiras de IPG com pI na faixa de 3-10 . (**Figura 20. A**). Visto que foi observada uma grande quantidade de “spots” concentrados na região compreendida na faixa de pI de 4-7, um novo mapa, utilizando-se tira de IPG com pI na faixa de 4-7 ,foi estabelecido (**Figura 20. B**).

Após a obtenção dos mapas bidimensionais, procedeu-se com a análise dos géis utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum. O programa detectou 353 “spots” no gel proveniente da separação das proteínas na faixa de pI de 3-10, e 455 no gel proveniente da separação das proteínas na faixa de pI de 4-7. Os “spots” detectados apresentaram uma variação de massa molecular de 11-85 KDa, sendo a maioria com massa molecular maior que 20 KDa. Entretanto, a maioria dos “spots” mais abundantes apresentaram massa molecular menor que 30 KDa.

Os parâmetros utilizados para detecção dos spots pelo programa foram feitos em cima do ajuste dos valores de “Smooth”, “Saliency” e “Min Area”. O “Smooth” fixa o número de vezes que o ImageMaster irá suavizar a imagem antes da detecção de “spots”, ele deve ser otimizado para detecção de todos os “spots” reais e dividir o maior número possível de “spots” sobrepostos, sem se preocupar com manchas de ruído, que podem ser filtrados com os parâmetros “Saliency” e “Min Area”. O parâmetro de “Saliency” é uma medida baseada na curvatura do “spot”. Ela indica o quanto um ponto se destaca em relação ao gel. Manchas reais de saliência geralmente têm valores elevados, enquanto artefatos e ruídos de fundo têm pequenas saliências. Ela é bastante eficiente na filtragem de spots. Depois de definido um valor de saliência adequado para filtrar todos os pontos de ruído, deve-se ainda livrar-se de artefatos como partículas de poeira, que consistem em alguns pixels muito escuros, usando o parâmetro “Min Area”, o qual elimina manchas que têm uma área menor do que o limite especificado (expressa em número de pixels). Os valores desses parâmetros que melhor se ajustaram para ambos os géis, foi de 2 para Smooth, 35.0000 para Saliência e 13 para Min Area.

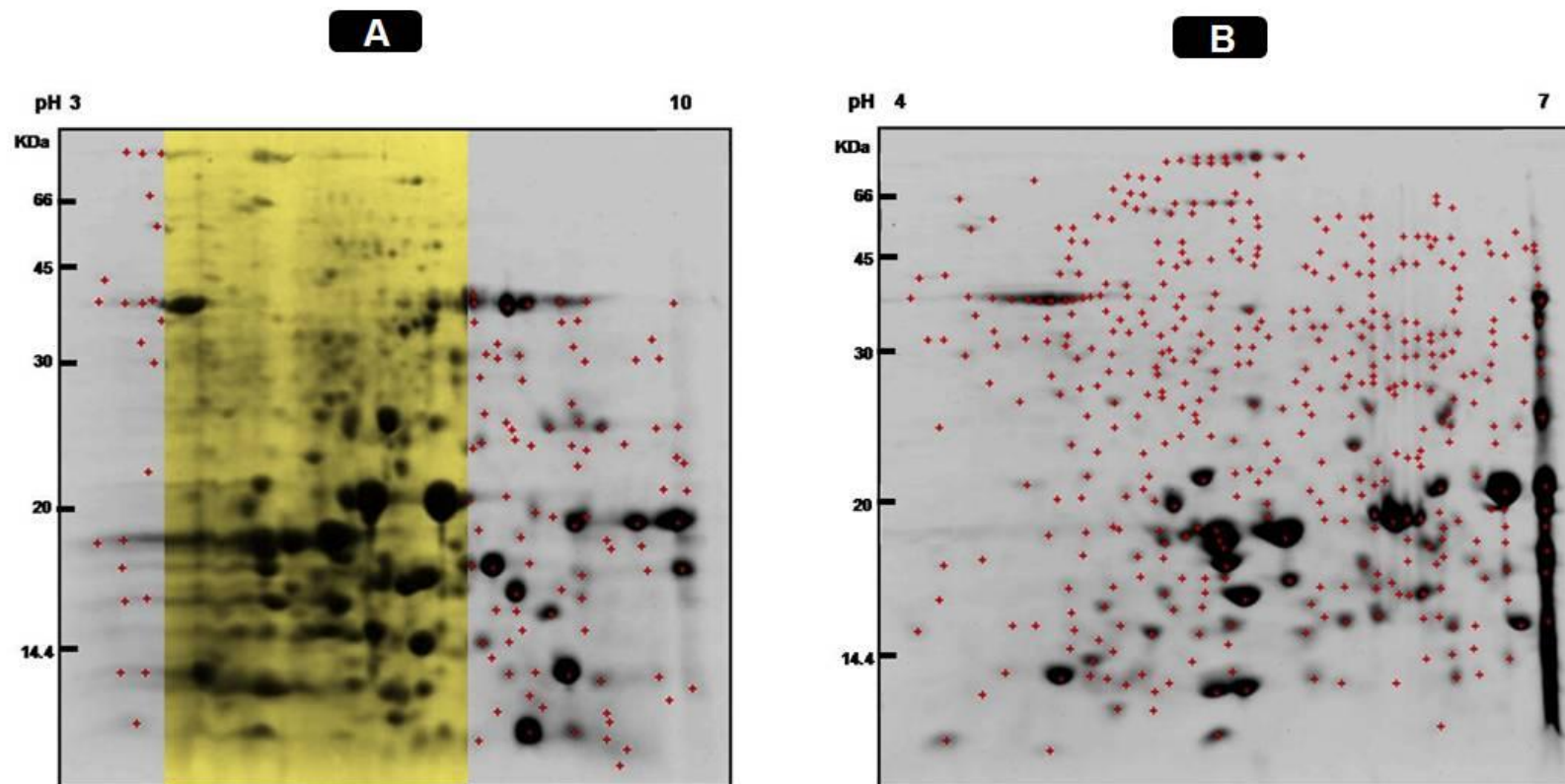


**Figura 20: Mapas bidimensionais da fração enriquecida de organelas.** Durante a primeira dimensão as proteínas foram separadas utilizando tira de IPG com pH na faixa de 3-10 (A) e na faixa de 4-7 (B). Aos géis foram aplicados 500µg de proteínas. Os géis, após a segunda dimensão, foram corados com Coomassie Phast Gel Blue R-350.

Dos 353 “spots” detectados no gel proveniente da corrida com tira de IPG com pH na faixa de 3-10, 241 se concentravam na faixa de pH 4-7 (**Figura 21.A**). Após a corrida com tira de IPG com pH na faixa de 4-7 foi possível detectar um aumento considerável na quantidade de “spots” detectados, passando de 241 para 455, acréscimo de 88,79% (**Figura 21.B**).

A partir dos géis obtidos da fração enriquecida de organelas, um total de 567 “spots” poderão ser excisados e digeridos para posterior análise por espectrometria de massa. Desses, 112 “spots” presentes no mapa bidimensional com tira de IPG com pH na faixa de 3-10 (excluindo os spots localizados na faixa de pH de 4-7) (**Figura 21.A**) e 445 presentes no mapa bidimensional com tira de IPG com pH na faixa de 4-7 (**Figura 21.B**) Tal fato mostra a importância de se ter utilizado tiras de IPG com pH na faixa de 4-7, o que possibilitará uma maior quantidade de proteínas identificadas por espectrometria de massa.

Os mapas bidimensionais obtidos da fração enriquecida de organelas poderão fornecer informações importantes. Fazendo uso da espectrometria de massa para identificação das proteínas presentes nessa fração, pode-se verificar se nessa amostra estão presentes proteínas plastidiais. Em caso de muitas destas proteínas serem identificadas nesta fração, pode-se inferir que uma grande quantidade de plastídios não intactos podem estar se sedimentando juntamente com as outras organelas que formam a fração enriquecida de organelas. Nesse caso, fazer alterações nos parâmetros utilizados, para a obtenção de um protocolo mais eficiente, em que os plastídios presentes em uma amostra estejam intactos e concentrados na fração enriquecida de plastídios, será conveniente.



**Figura 21: Mapas bidimensionais da fração enriquecida de organelas.** Durante a primeira dimensão as proteínas foram separadas utilizando tira de IPG com pH na faixa de 3-10 (**A**) e na faixa de 4-7 (**B**). Aos géis foram aplicados 500 $\mu$ g de proteínas. Os géis, após a segunda dimensão, foram corados com Coomassie Phast Gel Blue R-350. Em A, a região amarela corresponde à faixa de pH de 4-7, na qual pode ser observada uma grande quantidade de “spots” (241 “spots”) concentrados nessa região. Os spots que se localizam nessa faixa de pH puderam ser detectados de forma mais eficiente quando se utilizou tira de IPG com pH na faixa de 4-7. As marcações em vermelho correspondem ao total de spots, 112 “spots” em A e 455 “spots” em B.

#### 4.3.2. Fração rica em plastídios (Fração III)

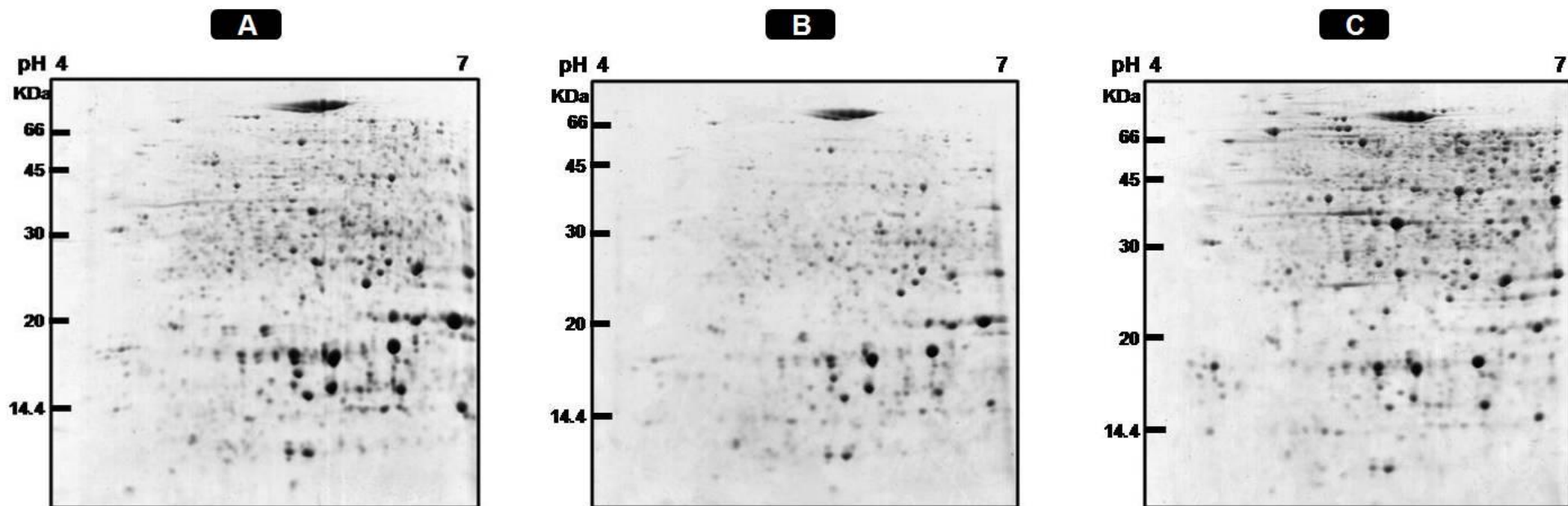
Três mapas bidimensionais, gel A, B e C, (**Figura 22**) utilizando tiras de IPG com pl na faixa de 4 a 7, foram obtidos a partir da fração enriquecida de plastídios. O gel A foi selecionado como gel de referência, nele foram aplicados 400µg de proteína (**Figura 22.A**)

A análise a respeito das semelhanças entre o gel de referência e os géis B e C foi realizada utilizando-se o ícone “scatter plot” do programa ImageMaster 2D Platinum, o qual proporciona informações sobre o grau de similaridade entre os géis, a partir do coeficiente de correlação (Corr). Este coeficiente pode variar de 1 a -1, em que um valor próximo a 1 indica um bom ajuste entre os géis. A análise do grau de similaridade entre o gel de referência e o gel B, apresentou um coeficiente de correlação de 0,972, enquanto entre o gel de referência e o gel C, foi de 0,717. Apesar das concentrações de proteínas aplicadas aos géis não terem sido as mesmas, devido à limitação na obtenção de maiores quantidades de proteína durante o processo de isolamento da fração enriquecida de plastídios, os valores mostram-se próximos a 1, sendo um indicativo de que os géis obtidos são reprodutíveis.

Após a separação das proteínas presentes na fração enriquecida de plastídios por eletroforese bidimensional, foram detectados, pelo programa ImageMaster 2D Platinum, 833 “spots” no mapa de referência. Os parâmetros utilizados para detecção dos spots pelo programa foram feitos em cima do ajuste dos valores de “Smooth”, “Saliency” e “Min Area”. Os valores desses parâmetros, que melhor se ajustaram aos géis, foi de 2 para Smooth, 35.0000 para Saliência e 13 para Min Area.

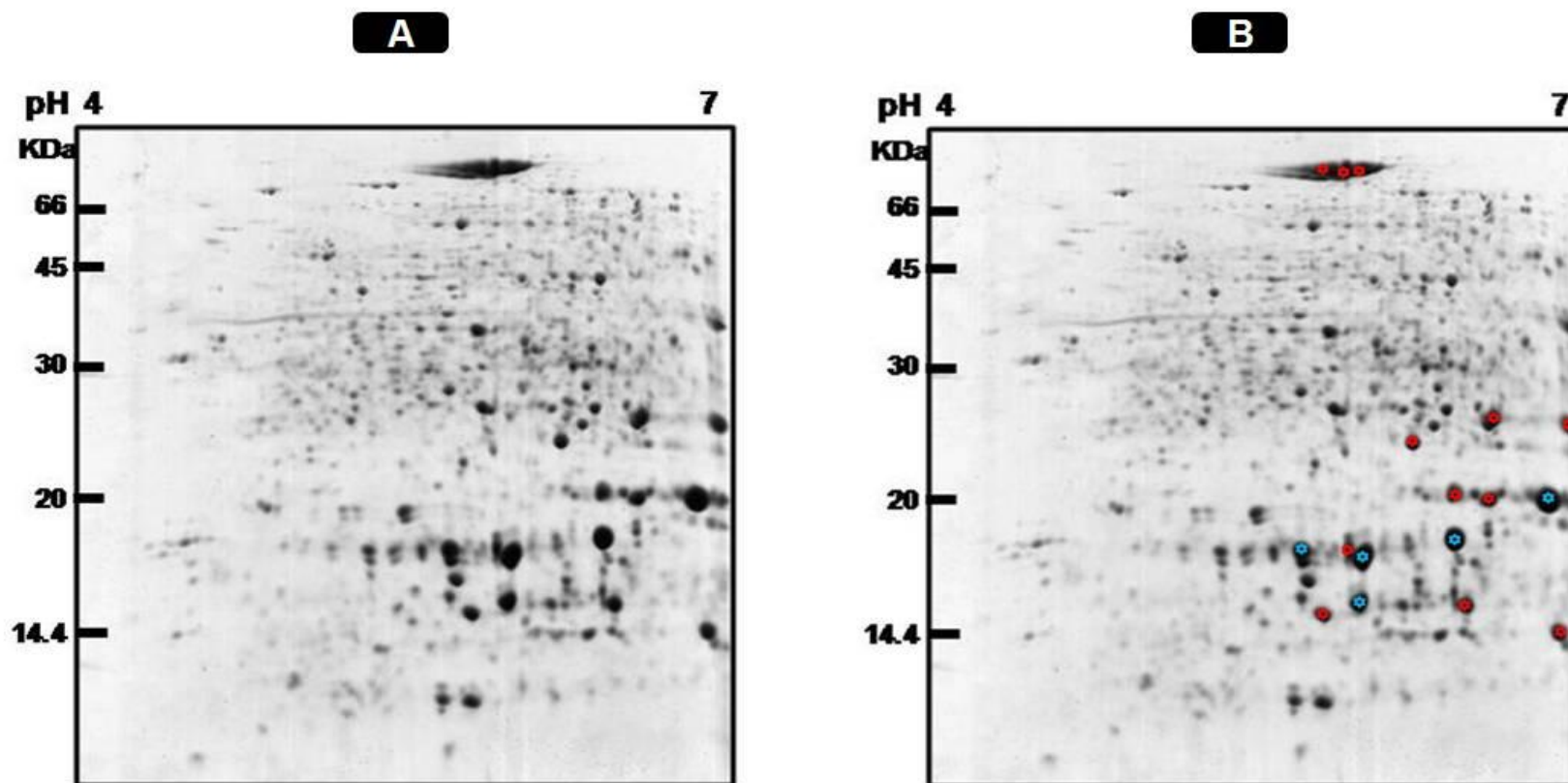
As análises iniciais dos géis obtidos a partir da fração enriquecida de plastídios mostraram que na faixa de pH de 4 a 7, a distribuição dos “spots” se deu de forma bastante uniforme, com baixa sobreposição observada entre os mesmos. Os “spots” apresentam-se bem definidos, sem “arrastados”, isso possivelmente ocorreu devido ao decréscimo de interferentes que foram progressivamente sendo retirados durante a série de centrifugações necessárias para a obtenção da fração enriquecida de plastídios.

Apesar de os spots apresentarem-se bem distribuídos nessa faixa de pH, observa-se que a região mais próxima ao pH 7 apresenta uma densidade de spots levemente maior que a mais próxima ao pH 4. Dessa forma, análises adicionais com tira de IPG de pH de 6-11, poderão proporcionar a detecção de um número maior de spots.



**Figura 22: Mapas bidimensionais da fração enriquecida de plastídios.** Três mapas bidimensionais, gel A, B e C, utilizando tiras de IPG com pH na faixa de 4 a 7 para fazer a separação protéica durante a primeira dimensão, foram obtidos a partir da fração enriquecida de plastídios. Os géis, após a segunda dimensão, foram corados com Coomassie Phast Gel Blue R-350. O gel A foi selecionado como gel de referência, ao qual foram aplicados 400 µg de proteína.

A análise do gel de referência da fração enriquecida de plastídios, utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum, mostra que os “spots” detectados apresentaram uma variação de massa molecular de 10-90 KDa e que a quantidade de spots detectada nesta 833 foi quase o dobro (1,8x a mais) da detectada na fração enriquecida de organelas 455, (quando os géis com tira de IPG de pH na mesma faixa são comparados) . Esta análise também mostrou um predomínio de “spots” detectados em baixa abundância, a maioria deles com massa molecular acima de 25 KDa (**Figura 23.A**).A análise quanto ao volume relativo que o spot ocupa no gel, mostrou que somente 17 dos “spots” que formam o gel de referência apresentam volume relativo maior que um, 5 destes possuindo intensidade relativa também maior que 1 (**Figura 23.B e Tabela 3**). Estes “spots” mais abundantes ficam localizados na região mais próxima ao pH 7 e a maioria apresenta massa molecular menor que 30.



**Figura 23: Mapa bidimensional de referência da fração enriquecida de plastídios.** (A) Gel de referência obtido da fração enriquecida de plastídios utilizando tira de IPG com pH na faixa de 4 a 7. Ele apresenta um predomínio de “spots” em baixa abundância, a maioria deles com massa molécula acima de 25 KDa. (B) Somente 17 dos “spots” que formam o gel de referência (833 “spots”) apresentam volume relativo maior que um (marcação em vermelho e azul), 5 destes possuindo intensidade relativa também maior que 1 (marcado em azul). Estes “spots” mais abundantes ficam localizados na região mais próxima ao pH 7 e a maioria apresenta massa molecular menor que 30.



**Tabela 3: “Spots” mais abundantes detectados no gel de referência obtido da fração enriquecida de plastídios utilizando tira de IPG com pH na faixa de 4 a 7. Somente 17 dos “spots” que formam o gel de referência apresentam volume relativo maior que um, 5 destes possuindo intensidade relativa também maior que 1 (linhas marcadas de cor marrom).**

SpotID	pl	MW	Intensidade	Área	Volume	% Intensidade	% Volume	Saliência
106	5.85948	82692	1.11602	7.71331	4.54098	<b>0.986566</b>	2.24161	2610.93
107	5.94741	83205	0.993734	7.01796	3.93519	<b>0.878468</b>	1.94257	1642.60
108	5.78707	82692	0.897988	7.56277	3.90200	<b>0.793829</b>	1.92619	1173.32
713	6.61724	25153	1.04276	6.60936	3.22162	<b>0.921804</b>	1.59032	3075.08
726	7.01293	24721	0.839856	7.89252	2.74829	<b>0.742439</b>	1.35667	3029.02
761	6.20086	23498	0.961327	5.16849	2.30095	<b>0.849820</b>	1.13584	4607.21
820	6.4034	20425	0.871333	6.82441	2.44958	<b>0.770265</b>	1.20921	3011.96
822	6.90172	19948	1.46822	15.6130	12.1219	<b>1.29791</b>	5.98388	7877.72
831	6.59655	20075	1.11285	6.54484	3.07074	<b>0.983765</b>	1.51584	4350.84
880	6.41810	18008	1.46928	10.8173	9.35749	<b>1.29885</b>	4.61924	9697.87
902	5.62672	17492	1.20039	7.87818	4.60273	<b>1.06115</b>	2.27209	3732.56
904	5.86983	17581	0.979244	5.68462	2.32221	<b>0.865747</b>	1.14634	1685.63
907	5.94224	17186	1.54240	12.6667	11.0764	<b>1.36350</b>	5.46776	8381.74
966	5.92931	15223	1.36373	7.69180	5.17737	<b>1.20555</b>	2.55576	7339.02
972	6.47500	15146	1.10478	6.16491	3.11718	<b>0.976631</b>	1.53877	5186.93
983	5.74052	14750	1.05340	5.42656	2.52687	<b>0.931212</b>	1.24737	4905.43
1000	6.95345	14094	0.945703	6.91043	2.86979	<b>0.836009</b>	1.41665	4184.52

Após futura identificação das proteínas por espectrometria de massa uma melhor análise sobre as proteínas, poderá ser feita utilizando informações conjuntas obtidas a partir do programa *ImageMaster 2D Platinum*, uma vez que este é capaz, por exemplo de calcular a quantidade relativa de proteína presente em cada “spot”, a partir da análise de intensidade, volume e área de cada um. Essa quantificação possibilitará, dessa forma, uma melhor definição acerca da variação do padrão da expressão

O isolamento da fração enriquecida de plastídios, com posterior extração e separação das proteínas por eletroforese bidimensional é uma estratégia bastante apropriada para aquisição de um maior conhecimento sobre o padrão de expressão protéica como também para fornecer maiores indícios a respeito da eficiência do protocolo para a obtenção da fração enriquecida de plastídios, quando aliada à espectrometria de massa

## **5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

O presente trabalho almeja identificar as proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e de ésteres de forbol, a qual ocorre nos plastídios.

De acordo com os resultados obtidos durante a caracterização morfológica, histológica e histoquímica, o estágio do desenvolvimento da semente escolhido para realização do isolamento de plastídios, foi aquele que apresentou as características descritas para sementes com 30 DAA.

Os resultados mostraram que o armazenamento de lipídios nas sementes de *J. curcas* se inicia a partir de 30 DAA, estágio no qual o endosperma já está bem diferenciado e fácil de ser isolado do restante da semente para posterior isolamento de plastídios.

Sementes com características morfológicas semelhantes às observadas com 25DAA, estágio que antecede imediatamente a deposição de lipídios, poderão ser utilizadas para estudos posteriores sobre as proteínas de interesse acima citadas. No presente trabalho não foi observada a deposição lipídios nesse estágio, entretanto Annarao, *et. al.* (2008) os detectou em estágios anteriores a 30 DAA, sugerindo que aos 25 DAA pode estar ocorrendo síntese de ácidos graxos que servirão de precursores para a formação de triacilgliceróis. Nesse estágio o endosperma já pode ser bem percebido e possível de ser isolado do restante da semente.

Os resultados obtidos a partir da caracterização morfológica, histológica, histoquímica e ultraestrutural, fornecem informações importantes acerca da escolha do melhor estágio do desenvolvimento da semente (30 DAA) a ser utilizado no presente trabalho, bem como para outros fins.

Também é importante ressaltar que, em condições de campo, a evolução de determinadas características não é fácil de ser monitorada e a fixação de uma data ou época para a ocorrência da maturidade fisiológica, em função de eventos como semeadura, florescimento e frutificação, pode apresentar diferenças para uma mesma espécie e cultivar em função das condições de clima, estado nutricional das plantas, dentre outros fatores. Portanto, torna-se necessário conhecer outros parâmetros que permitam detectar a maturidade fisiológica, correlacionando-a com características morfológicas da planta, dos frutos e/ou sementes. Tal fato destaca, mais uma vez, a importância da caracterização morfológica da semente em desenvolvimento de *J. curcas*, bem como em uma variedade de aspectos, realizadas no presente trabalho.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica sugerem que a camada localizada na interface 35-22% do gradiente descontínuo de PBF-Percoll é enriquecida de plastídios. Os mapas bidimensionais obtidos da fração enriquecida de organelas e de plastídios deverão ter seus “spots” excisados e identificados por espectrometria de massa, para fornecer um melhor conhecimento a respeito das proteínas presentes nessas amostras, bem como do padrão de expressão das mesmas.

Estratégias estão sendo desenvolvidas para remoção e degradação dos ésteres de forbol, (MAKKAR *et. al.*, 2009), entretanto estas não são atrativas economicamente. Seria, portanto, interessante a realização de estudos direcionados para o desenvolvimento de plantas de *J. curcas* geneticamente modificadas, para que as mesmas passem a apresentar maior padrão de qualidade com relação à síntese de ácidos graxos e diminuição dos níveis de ésteres de forbol. Nesse contexto, estratégia de silenciamento gênico poderá ser utilizada para impedir a expressão de um determinado gene relacionado à via de síntese dos diterpenos, sendo os ésteres de forbol um deles.

Deve-se levar em consideração que enzimas envolvidas na via de síntese dos ésteres de forbol, também podem ser fundamentais para a via de síntese de outros compostos, possivelmente essenciais para a planta. Dessa forma, um estudo a respeito dessas enzimas deve ser criterioso para que a escolha do gene a ser silenciado não impossibilite o funcionamento de outras vias.

A técnica de silenciamento gênico também poderá ser utilizada para inativar genes relacionados com a produção de ácidos graxos que não apresentam características apropriadas para a produção de biodiesel e que diminuem a eficiência da obtenção de óleo de qualidade desejável.

A identificação das proteínas detectadas nos géis bidimensionais da fração enriquecida de plastídios, com análise da variação do padrão de expressão da mesma, fornecerá suporte para os estudos mencionados acima. O desenvolvimento de pesquisas voltadas para o melhoramento genético do pinhão manso, que viabilize a obtenção de óleo de melhor qualidade nas suas sementes, e que possibilite a produção de sementes não tóxicas, livres de ésteres de forbol, para que as mesmas possam ser utilizadas como fonte de alimento, poderá ser uma via para o progresso dessa cultura, que assim como a mamona, torne-se uma grande cultura com aplicação industrial.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTENA, W. M. J.; VERCHOTB, L.; FRANKENC, Y. J.; MATHIJSD, E.; SINGHE, V.P.; AERTSA, R. e MUYSA, B. Review *Jatropha* biodiesel production and use. **Biomass and bioenergy** 32: 1063–1084, 2008.

ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; Hecker, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry** 23:129–132, 1984.

ANDERSEN, J. S. e MANN, M. Organellar proteomics: turning inventories into insights. **EMBO reports** 7(9): 874-879, 2006.

ANNARAO, S.; SIDHU, O. P.; ROY, R.; TULI, R.; KHETRAPAL, C. L. Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L. seeds using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Bioresource Technology**. 99: 9032-9035, 2008.

BADAMI, R.C. e K.B. PATIL. Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils. **Progress in Lipid Research**, 19:119–153, 1981.

BAGINSKY, S.; GROSSMANN, J.; GRUISSEM, W. Proteome analysis of chloroplast mRNA processing and degradation. **Journal of Proteome Research**, 6(2):809-820, 2007.

BALMER, Y.; VENSEL, W. H.; DUPONT, F. M.; BOB B. BUCHANAN, B. B.; HURKMAN, W. J. Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. **Journal of Experimental Botany - Plant Proteomics Special Issue**, 57(7): 1591–1602, 2006.

BERGER, F.; GRINI, P. E.; SCHNITTGER, A. Endosperm: an integrator of seed growth and development. **Current Opinion in Plant Biology**. 9: 664-670, 2006.

BEWLEY, J. D. e BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination** (Plenum, New York), 2<sup>a</sup> edição, 1994.

BOISNARD-LORIG, C.; COLON-CARMORA, A.; BAUCH, M.; HODGE, S.; DOERNER, P.; BANCHAREL, E.; DUMAS, C.; HASELOFF, J.; F. BERGER, F. Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains, **Plant Cell** 13 : 495–509, 2001.

BOYLE, S. A.; HEMMINGSEN, S. M.; DENNIS, D. T. Uptake and Processing of the Precursor to the Small Subunit of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase by Leucoplasts from the Endosperm of Developing Castor Oil Seeds. **Plant Physiology**. 81: 817-822, 1986.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of  $\mu\text{g}$  quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254, 1976.

BRADFORD, K.J. Water stress and the water relations of seed development: a critical review. **Crop Science**. 34: 1-11, 1994.

BROUN, P.; S. BODDUPALLI; C. SOMERVILLE. A bifunctional oleate 12-hydroxylase: Desaturase from *Lesquerella fendleri*. **Plant Journal**. 13:201–210, 1998.

BROWN, R.; LEMMON, B.E.; NGUYEN, H.; OLSEN, O.-A. Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*, Sex. **Plant Reprod**. 12: 32–42, 1999.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Capítulo 10: **In Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, 2000.

CANALES, C.; BHATT, A. M.; SCOTT, R.; DICKINSON, H. EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. **Current Biology**, 12:1718-1727, 2002.

CHENICLET, C.; CARDE, J.-P. Differentiation of leucoplasts: Comparative Transition of Proplastid to Chloroplasts or Leucoplasts in Trichomes of *Stachys lanata* Leaves. **Protoplasma**, 143: 74-83, 1988.

DREXLER, H.; SPIEKERMANN, P.; MEYER, A.; DOMERGUE, F.; ZANK, T.; SPERLING, P.; ABBADI, A.; HEINZ, E. Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: Strategies, problems and first results. **Journal of Plant Physiology**, 160:779–802, 2003.

DUMA, C. e ROGOWSKY, P. Fertilization and early seed formation. Review. **Comptes rendus biologies**. 331: 715-725, 2008.

EVANS, F. J. Naturally occurring phorbol esters. **Boca Raton, FL: CRC Critical Review in Toxicology**, 1986.

FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. **Natural Resources Forum**. 29 (1): 12 - 2005.

GARCIA, D.; SAINGERY, V.; CHAMBRIER, P.; MAYER, U.; JÜRGENS, G.; BERGER, F. *Arabidopsis* haiku mutants reveal new control of seed size by endosperm. **Plant Physiology**. 131: 1661-1670, 2003.

GARCIA, D.; FITZ GERALD J. N. e BERGER, F. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 17:52-60, 2005.

GAUTHIER, D. J. e LARUZE, C. Complementary methods to assist subcellular fractionation in organellar proteomics. **Expert Review of Proteomics** 5(4), 603-617, 2008.

GIACOMELLI, L.; RUDELLA, A.; VAN WIJK, K. J. High light response of the thylakoid proteome in *Arabidopsis* wild type and the ascorbate-deficient mutant *vtc2-2*. A comparative proteomics study. **Plant Physiology**, 141:685-701, 2006.

GOEL, G.; HARINDER, P. S.M.; FRANCIS, G. e BECKER, K. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. **International Journal of Toxicology**, 26:279–288, 2007.

GREENWOOD, J. S.; BEWLEY, J. D. Seed development in *Ricinus communis* (castor bean). I. Descriptive morphology. **Canadian Journal of Botany**. 60(9): 1751–1760, 1982.

GREENWOOD, J. S.; GIFFORD, D. J. e BEWLEY, J. D. Seed development in *Ricinus communis* cv. Hale (castor bean). II. Accumulation of phytic acid the development endosperm and embryo in relation to deposition of lipid, protein and phosphorus. **Canadian Journal of Botany**. 62, 255–261, 1984.

GREENWOOD, J.S., e J.D. BEWLEY. Seed development in *Ricinus communis* L. cv. Hale: III. Pattern of storage protein and phytin accumulation in the endosperm. **Canadian Journal of Botany**, 63:2121–2128, 1985

GREENWOOD, J. S.; HELM. M.; GIETL. C. Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. **PNAS**,102(6): 2238–2243, 2005.

GRUSHCOW, J. e M.A. SMITH. Engineering high-performance biolubricants in crop plants. **Industrial Biotechnology**. 2:48–50, 2006.

GUITTON, A. E., PAGE, D. R., CHAMBRIER, P., LIONNET, C., FAURE, J. E., GROSSNIKLAUS, U., BERGER, F. Identification of new members of fertilization independent seed polycomb group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, 131:2971-2981, 2004.

GUNAWARDENA, A. H.; PEARCE, D. M., JACKSON, M. B., HAWES, C. R. e EVANS, D. E. Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, 2: 212, 205–214, 2001.

GUPTA, R. e SINGH, R. Fatty acid synthesis by isolated leucoplasts from developing *Brassica* seeds: Role of nucleoside triphosphates and DHAP-shuttle as the source of energy. **Journal of Biosciences**, 21(6): 819-826, 1996.

GUZMAN, L. P. e AQUINO, A. L. Seed Characteristics and Storage Behavior of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). **Philippine Journal of Crop Science (PJCS)**, 34 (1):13-21,2009.

HAAS, W.; H. STERK, e M. MITTELBACH. Novel 12-deoxy-16- hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**. 65:1434–1440, 2002.

HAO,Q.; PEUMANS, W. J. e VAN DAMME, E. J. M. Type-1 ribosome-inactivating protein from iris (*Iris hollandica* var.Professor Blaauw) binds specific genomic DNA fragment **Biochemistry Journal** 357, 875-880, 2001.

HAUGHN. G. e CHAUDHURY A. Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. **Trends Plant Science**, 10:472-477, 2005.

HELLER. J. Physic nut – *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. **Rome Italy: International Plant Genetic Resources Institute**. p. 66, 1996.

HENNING, R. K. The *Jatropha* system, integrated rural development by utilization of *Jatropha curcas* L. (JCL) as raw material and as renewable energy. **www.jatropha.org** 2006; (Accessed on 20 October 2009).

HILLS, M. J. Control of storage-product synthesis in seeds. **Current Opinion in Plant Biology**. 7: 302-308, 2004.

HIROTA, M.; SUTTAJIT, M.; SUGURI, H; ENDO, Y; SHUDO, K.; WONGCHAI, V; HECKER, E. e FUJIKI, H. A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. **Cancer Res**. 48:5800–5804, 1988.

HUANG, A. H. C. Oil Bodies and Oleosins in Seeds. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Vol. 43: 177-200, 1992.

HUANG, M; HOU, P.; WEI, Q.; XU, Y. e CHEN, F. A ribosome-inactivating protein (curcin 2) induced from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco. **Plant Growth Regulation**, 54(2): 115-123, 2008.

HUBER, L. A.; PFALLER, K.; VIETOR, I. Organelle Proteomics Implications for Subcellular Fractionation in Proteomics. **Circulation Research**, 962-968, 2003.

JAIN, R.; KATAVIC, V.; AGRAWAL, G. K.; GUZOV, V. M.; THELEN, J. J. Purification and proteomic characterization of plastids from *Brassica napus* developing embryos. **Proteomics**, 8: 3397–3405, 2008.



JING, L.; FANG, Y.; YING, X.; WENXING, H.; MENG, X.; SYED, M. N.; FANG, C. Life Toxic impact of ingested Jatropherol-I on selected enzymatic activities and the ultrastructure of midgut cells in silkworm, *Bombyx mori* L. **JEN**, 129(2): 98-104, 2005.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 27: 137-138, 1965.

KAUSHIK, N. e KUMAR, S. *Jatropha curcas* L. Silviculture and Uses. **Agrobios** (India), Jodhpur, 2004.

KINNEY A.J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Food Lipids**, 3:273–292, 1996

KLEFFMANN, T., ZYCHLINSK, A., RUSSENBERGER, D., HIRSCH-HOFFMANN, M., GEHRIG, P., GRUISSEM, W. e BAGINSKY, S. Proteome dynamics during plastid differentiation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology* 1343, 912-923, 2007.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik** 26, 231-243, 1975.

KUMAR, A. e SHARMA, S. Review An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial crops and products**, 28: 1–10, 2008.

LAKSHMINARAYANA, M. e SUJATHA, M. Screening of *Jatropha* species against major defoliators of castor. *Journal of Oilseeds Research*, 18: 22-230, 2001

LAM, E. e GREENBERG, J. Cell death: the 'Yin' path in the balancing act of the life cycle **Plant Molecular Biology**, 44(3): vii-viii. 2000.

LAMBERT, J-P.; ETHIER, M.; SMITH, J. C. e FIGEYS, D. Proteomics: from gel based to gel free. **Analytical Chemistry**, 77, 3771-3788, 2005.

LIU, Q., S.P. SINGH, e A.G. GREEN. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant Physiology**. 129:1732–1743, 2002.

LOPEZ-JUEZ, E; PYKE, K. A. Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. **International. Journal of Developmental Biology**, 49: 557-577, 2005.

LUO, M., DENNIS, E. S., BERGER, F., PEACOCK, W. J., CHAUDHURY, A. MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) kinase gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science USA (PNAS)**, 102:17531-17536, 2005.

LUO, M. J.; LIU, W. X.; YANG, X. Y.; HUANG, P. e CHEN, F. Cloning, Expression, and Antitumor Activity of Recombinant Protein of Curcin. **Russian Journal of Plant Physiology**, 54(2): 202–206, 2007.

MAKKAR, H. P. S. e K. BECKER. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 45: (3): 152–3157 1997.

MAKKAR, H.; MAES, J.; GREYT, W.; BECKER, J. K. Removal and Degradation of Phorbol Esters during Pre-treatment and Transesterification of *Jatropha curcas* Oil. **The American Oil Chemists' Society**, 86:173–181, 2009.

MELO, J.C.; BRANDER JÚNIOR, W.; CAMPOS, R. J. A.; PACHECO, J. G. A.; SCHULER, A. R. P.; STRAGEVITCH, L. Avaliação preliminar do potencial do pinhão manso para a produção de biodiesel. In: **Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília. *Anais*. Brasília: 2006.

MIERNYK, J. A. The isolation and characterization of nongreen plastids. In LINSKENS, H. F. e JACKSON, J. F., eds, **Modern Methods of Plant Analysis**, New Series vol 1, Springer-Verlag, Berlin, pp 259-295, 1985.

MIERNYK, J. A. Leucoplast isolation. In Boyer C. D.; Shannon, J. C.; Hardison, R. C. **Physiology, Biochemistry, and Genetics of Nongreen Plastids**. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, MD, pp 15-23, 1989.

MIFLIN, B. J. e BEEVERS, H. Isolation of Intact Plastids from a Range of Plant Tissues. **Plant Physiology**. 53: 870-874, 1974.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animal, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research** 40 325–438, 2001.

NEGM, B. F.; CORNEL, F. A.; PLAXTON, W. C. Suborganellar Localization and Molecular Characterization of Nonproteolytic Degraded Leucoplast Pyruvate Kinase from Developing Castor Oil Seeds. **Plant Physiology**. 109:1461-1469, 1995.

NERY, F. C. Aspectos da Germinação, Armazenamento de Sementes, Crescimento Inicial e Anatomia de Plantas Jovens de *Calophyllum brasiliense* Cambess. **Dissertação**. Universidade Federal de Lavras Minas Gerais, 2006.

NEUHAUS, H. E. e EMES, M. J. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51: 111-140, 2000.

NUNES, C. F. Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão manso (*Jatropha curcas*). **Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras**, 2007.

O' FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, **Journal Biology Chemistry**. 250: 3007-4021, 1975.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, 19: 1-15, 2000.

PASQUALI, C.; FIALKA, I.; HUBER, L. A. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applications**. 722:89–102, 1999.

PELTIER, J. B.; CAI, Y.; SUN, Q.; ZABROUSKOV, V.; GIACOMELLI, L.; RUDELLA, A.; YTTERBERG, A. J.; RUTSCHOW, H. e VAN WIJK, K. J. The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. **Molecular & Cellular Proteomics** 5:114-33, 2006.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particules with Percoll. The **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 44(1-2): 1-30, 2000.

PRIMAVESI, L. F. ; WU, H. ; MUDD, E. A. ; DAY, A. ; JONES, H. D. Visualisation of plastids in endosperm, pollen and roots of transgenic wheat expressing modified GFP fused to transit peptides from wheat SSU RubisCO, rice FtsZ and maize ferredoxin III proteins. **Transgenic Research**, 17:529–543, 2008.

RAJU, A. J. S. e EZRADANAM. V. Pollination ecology and fruiting behavior in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science – Research communications**. 83 (11), 1395- 1398, 2002.

RUTSCHOW, H.; YTTERBERG, A. J.; FRISO, G.; NILSSON R e VAN WIJK, K. J. Quantitative proteomics of a chloroplast SRP54 sorting mutant and its genetic interactions with CLPC1 in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 148: 156-175, 2008.

SANTOS, K. S.; DOS SANTOS, L. D.; MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nursehoneybees(*Apis mellifera* L.). **Insect Biochemistry Molecular Biology** v. 35, p. 85-91, 2005.

SCHRUFF, M. C.; SPIELMAN, M., TIWARI, S., ADAMS, S., FENBY, N., SCOTT, R. J.. The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. **Development**, 133:251-261, 2006.

SHEARER, H. L.; TURPIN, D. H.; DENNIS, D. T. Characterization of NADP dependent malic enzyme from developing castor oil seed endosperm. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 429: 134–144, 2004.

SIDDIQUE, M.A.; GROSSMANN, J.; GRUISSEM, W. e BAGINSKY, S. Proteome analysis of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) chromoplasts. **Plant Cell Physiology**, 47: 1663-1673, 2006.

SILINSKY, E. M., e T. J. SEARL. Phorbol esters and neurotransmitter release; more than just protein kinase C? **British Journal of Pharmacology**, 138:1191–1201, 2003.

SILOTO, R. M. P.; FINDLAY, K.; LOPEZ-VILLALOBOS, A.; YEUNG, E. C.; NYKIFORUK, C. L. e MOLONEY, M. M. The Accumulation of Oleosins Determines the Size of Seed Oilbodies in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18:1961-1974, 2006.

SILVA, J. N.; SOBRINHO, J. C.; CARVALHO, J. A.; DIAS, D. C. F. S; REIS, F. P. Physiological quality of sorghum seeds collected at different points in the dryer. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 5(3): 487-491, 2001.

SIMCOX, P. D.; GARLAND, W.; DE LUCA, V.; CANVIN, D. T. e DENNIS, D. T. Respiratory pathways and fat synthesis in the developing castor oil seed. **Canadian Journal of Botany** 57: 1008-1014, 1979.

SLABAS, A. R. e FAWCETT, T. The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. **Plant Molecular Biology** 19: 169-191, 1992.

SMITH, R. G.; GAUTHIER, D. A.; DENNIS, D. T.; TURPIN, D. H. Malate- and Pyruvate-Dependent Fatty Acid Synthesis in Leucoplasts from Developing Castor Endosperm. **Plant Physiology**. 98, 1233-1238, 1992.

SMITH, M.A.; MOON, H.; CHOWRIRA, G.; KUNST, L. Heterologous expression of a fatty acid hydroxylase gene in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, 217:507–516, 2003.

SMITH, M. A. Engineering Oilseeds for Industry. In JANICK, J. e WHIPKEY, A. **Issues in new crops and new uses. Figura 10 C2Industrial Oilseeds** p. 90 - 94, 2007

SOLL, J. Protein import into chloroplasts. **Current Opinion in Plant Biology**, 5: 529-535, 2002.

SOLSOLOY, A. D. e SOLSOLOY, T. S. Pesticidal efficacy of formulated *J. curcas* oil on pests of selected field crops. In: Gubitz, G.M., Mittelbach, M., Trabi, M. (Eds.), *Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas**. **DBV Graz**, pp. 216–226, 1997.

STASYK, T. e HUBER, L. A. Zooming in: fractionation strategies in proteomics. **Proteomics**, 4(12), 3704-3716, 2004.

STECK, T. L.; STRAUS, J. H.; WALLACH, D. F. A model for the behavior of vesicles in density gradients: implications for fractionation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 203(3), 385-393, 1970.

STOUTJESDIJK, P. A.; HURLESTONE, C.; SINGH, S. P. e GREEN, A.G. High oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous delta-12 desaturases. **Biochemical Society Transactions**. 28:938–940, 2000.

SUBRAMANIAN, K. A.; SINGAL, S. K.; SAXENA, M.; SINGHAL, S. Utilization of liquid biofuels in automotive diesel engines: an Indian perspective. **Biomass & Bioenergy**, 29: 65-72, 2005.

THAKER, V. Changes in water content, sugars and invertase activity in developing seeds of *Hibiscus esculentum*. **Acta Physiologiae Plantarum**, 21: 155-159, 1999.

THORNE, J. H.. Morphology and ultrastructure of maternal seedcoat tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. **Plant Physiology**, 67:1016-1025, 1981.

VAN DEN BERG, A. J. J.; HORSTEN, S. F. A. J.; KETTENES- VAN DEN BOSCH, J. J.; HROES, B. H.; BEUKELMAN, C. J.; LEEFLANG, B. R. e LABADIE, R. P. Curcacyclina A – a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L. **FEBS letters**, 358, 3 215-218, 1995.

VASCONCELOS, É. A. R., NOGUEIRA, F. C. S., ABREU, E. F. M., GONÇALVES, E. F., SOUZA, P. A. S., CAMPOS, F. A. P. “Protein Extraction from Cowpea Tissues for 2-D Gel Electrophoresis and MS Analysis”. **Chromatographia**, 62, 447-450, 2005.

VICENTE-CARBAJOSA, J. e CARBONERO, P. Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. **Journal of Developmental Biology**, 49: 645-651 2005.

WANG, H., LI, J. e GILCHRIST, D. G. Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development. **Plant Cell** 8, 375–391, 1996.

WANG, M. B. e WATERHOUSE, P. M.. Application of gene silencing in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 5:146–150, 2002.

WANG, X.; XU, C; WU, R. e LARKINS, B. A. Genetic dissection of complex endosperm traits. **Trends in plant science**, 14(7): 392-398, 2009.

WINK, M.; KOSCHMIEDER, C.; SAUERWEIN, M. E SPORER, F. Phorbol esters of *Jatropha curcas*—Biological activities and potential applications. In **Biofuel and industrial products from *Jatropha curcas***, ed. G. M.G"ubitz, M. Mittelbach, e M. Trabi, 160–166. Graz, Austria: Dbv-Verlag University of Graz, 1997.

XU, H. e LIU, W. Cinnamomin—a Versatile Type II Ribosome-inactivating Protein **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 36(3): 169–176, 2004.

YANG, M. F.; LIU, Y. J.; LIU Y.; CHEN, H.; CHEN, F. SHEN, S. H. Proteomic analysis of oil in seed germination and post germination development of *Jatropha curcas*. **Journal of Proteome Research**, 2009.

YOULE, R. J. e HUANG A. H. C. Protein body from the endosperm of Castor bean. **Plant Physiology**, 58: 703-709, 1976.

YTTERBERG, A. J.; PELTIER, J. B. e VANWIJK, K. J. Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. **Plant Physiology**, 140:984-97, 2006.

## 7. ANEXO

**I.I. Solução de Karnovsky (5:3:2)**

Glutaraldeído	1%
Formaldeído	4%
Tampão fosfato pH 7,2	0,2 M

**I.II. Tampão de homogeneização**

HEPESKOH, pH 7.5	50 mM
D-Sorbitol	0.4 M
EDTA	2 mM
EDTA.Na2.2H2O	2 mM
MgCl2.6H2O	1 mM
DTT	1 mM
BSA	1% (p/v)
Ficoll	1% (p/v)
NaF	20 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-

**I.III. Solução PBF-Percoll**

PEG 8000 ou PEG 4000	3% (p/v)
BSA	1% (p/v)
Ficoll	1% (p/v)
Percoll	-

**I.IV. Tampão de extração**

Piridina/ HCl pH5,0	50nM)
Tiuréria	10mM
SDS	1%

**I.V. Solução de reidratação**

Uréia	7 M
Tiuréria	2M
DTT	65mM
CHAPS	1%
IPG Buffer	0,5%
Azul de Bromofenol	traços

**I.VI.Solução de equilíbrio**

Tris/HCL pH8,8	50mM
Glicerol	30%
Ureia	6mM
SDS	2%
Azul de bromofenol	traços

**I.VII. Tampão de amostra**

Tris/HCL pH6,8	1M
Glicerol	2%
SDS	10%
Azul de bromofenol	traços

**I.VIII. Main Gel (15%)**

Bis-Acrilamida 30%	15ml
Tris 1,5M pH 8,8	7,5 ml
SDS 10%	300 µl
PSA 10%	300 µl
TEMED	24 µl
H <sub>2</sub> O destilada	6,9 ml

**I.IX. Tampão de corrida**

Tris	0,25M
Glicina	1,92M
SDS	1%
H <sub>2</sub> O destilada	p/ 1000ml

**I.X. Sol. Corante PhastGel Blue R-350****Estoque:**

1 tablete em 80 ml de água (agito por 10 minutos) + 120 ml de metanol (agito até completa dissolução, filtração).

**Corante 0,02%:**

100 ml de corante estoque + 900 ml de solução descorante .

**I.XI. Solução Descorante**

ácido acético: metanol: água (1:3:6)

### FICHA CATALOGRÁFICA

P718i Pinheiro, Camila Barbosa  
Isolamento de plastídios do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) / Camila Barbosa Pinheiro, 2010. 103 f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Pós-Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos  
Área de concentração: Bioquímica Vegetal  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2010.

1. Pinhão manso. 2. Eletroferese bidimensional. 3. Histoquímica. I. Campos, Francisco de Assis de Paiva (Orient.). II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDD 574.192