

**GALACTOMANANA DE *Caesalpinea pulcherrima*:
BIOSSÍNTESE, ESTRUTURA E APLICAÇÃO EM MATRIZES
CROMATOGRÁFICAS**

LIA MAGALHÃES DE ALMEIDA SILVA

FORTALEZA-CEARÁ

2005

**GALACTOMANANA DE *Caesalpinia pulcherrima*:
BIOSSÍNTESE, ESTRUTURA E APLICAÇÃO EM MATRIZES
CROMATOGRÁFICAS**

LIA MAGALHÃES DE ALMEIDA SILVA

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA – CEARÁ

2005

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Lia Magalhães de Almeida Silva

Tese APROVADA em 08/07/2005

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador da Tese

Prof. Dr. Gerardo Pérez Gómez
Departamento de Química -Universidade
Nacional de Colombia

Prof. Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná
Co-Orientadora

Prof. Dr. Joaquim Enéas Gomes Filho
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Maria Izabel Gallão
Depto. de Biologia
Universidade Federal do Ceará

A Deus,

*Por estar ao meu lado e me guiar em
cada passo da minha vida,*

Agradeço.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira, exemplo para meu aprimoramento profissional, bem como pela sincera amizade e compreensão demonstrada no convívio diário.

A Profa. Dra. Carmen de Oliveira Petkovicz por sua colaboração e sugestões apresentadas durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho e a Profa. Dra. Izabel Gallão pela orientação e contribuição na execução de parte desse trabalho.

A Profa. Dra. Regina Célia de Paula Monteiro pelas sugestões apresentadas na execução de parte das análises.

A querida amiga Alexsandra Feitosa Ribeiro, pelo incentivo, companherismo e amizade sempre demonstrada.

A todos os meus amigos do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados (LABLEC), que sempre compartilharam comigo sua amizade e carinho.

Aos meus pais Manoel (*in memorian*) e Alda, por serem exemplo de vida e me ensinarem a ir à busca dos meus ideais, com alegria, paciência e determinação.

Ao meu esposo Nivardo Júnior e filhos Vanessa e Bruno, pelo carinho, incentivo, compreensão e por serem a fonte de inspiração para eu seguir sempre em frente.

As minhas queridas irmãs Érica e Dóris, pelo incentivo e ajuda nos meus momentos mais difíceis.

E a todos aqueles que não citei aqui, mas que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças as seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênios firmados com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa –FUNCAP

Laboratório de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná - UFPr.

Laboratório de Morfologia Vegetal- Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará-UFC.

Laboratório de Cereais do Curso de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará- UFC.

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará - UFC.

NUTEC - Núcleo Tecnológico em Ciência e Tecnologia do Estado do Ceará

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

SUMÁRIO

	pg.
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1- INTRODUÇÃO	01
1.1-Considerações gerais	01
1.2-Gomas	03
1.3-Sementes	09
1.4-Desenvolvimento da semente	15
1.5-Parede celular	21
1.6-Lectinas	50
1.7-A espécie <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	57
2- OBJETIVO GERAL	59
3- ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	59
4- MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1- Plantio	60
4.2- Colheita das vagens	60
4.3- Caracterização da semente e evolução de seu crescimento	60
4.4- Determinação da massa fresca e massa seca	60
4.5- Análise química	61
4.5.1- Determinação de umidade	61
4.5.2- Determinação de cinzas	61
4.5.3- Determinação de nitrogênio total	61
4.5.4- Determinação de lipídios totais	62
4.6- Obtenção do endosperma bruto da semente de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	62
4.7- Determinação da proteína solúvel do endosperma	63
4.8- Obtenção dos polissacarídeos do endosperma	63
4.9- Caracterização físico-química das diferentes frações polissacarídicas	63
4.9.1-Estimativa da massa molar por GPC	63

4.9.2- Viscosidade	64
4.9.3- Hidrólises ácidas	66
4.9.4- Determinação de açúcares por cromatografia em camada delgada	66
4.9.5- Redução e acetilação dos produtos das hidrólises ácidas	67
4.9.6- Cromatografia líquido-gasosa (GLC)	68
4.9.7- Espectro no Infravermelho	68
4.10- Modificação química da goma endospermica de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	68
4.11- Montagem das colunas cromatográficas	69
4.12- Cromatografia de afinidade	69
4.13- Ensaio de atividade hemaglutinante	69
4.14- Eletroforese em gel de poliacrilamida	70
4.15- Determinação da atividade α -galactosidásica	70
4.16- Microscopia de luz	71
4.16.1-Fixação	71
4.16.2-Colorações	71
(i)-Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT)	71
(ii)-Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP)	71
(iii)- Ácido Periódico de Schiff (PAS)	72
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1- Evolução do desenvolvimento da semente de <i>C. pulcherrima</i>	73
5.1.1- Crescimento da semente	73
5.1.2- Determinação da massa fresca e massa seca	77
5.1.3- Análise química do endosperma	86
5.1.4- Análise química dos cotilédones	90
5.2- Análise morfológica da semente	93
5.3- Extração e obtenção dos polissacarídeos endospermicos	102
5.4- Parâmetros físico-químicos para caracterização estrutural das galactomananas	105
5.4.1- Cromatografia em camada delgada (CCD)	105
5.4.2-Cromatografia de permeação em gel (GPC)	105
5.4.3- Determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$	111
5.4.4- Cromatografia líquido-gasosa (GLC)	114
5.4.5- Espectro no infravermelho (IR)	118

5.4.6- Determinação de atividade α -galactosidásica	121
5.4.7- Cromatografia de afinidade em coluna de goma de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> ..	124
5.4.8- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol das frações protéicas obtidas na cromatografia de afinidade	130
6. CONCLUSÕES	133
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

LISTA DE FIGURAS

	pg
Figura 1 Desenvolvimento da semente de <i>Vicia faba</i>	18
Figura 2 Modelo de parede celular primária	28
Figura 3 Estrutura clássica das galactomananas vegetais	36
Figura 4 Possíveis arranjos das unidades de galactose na cadeia de manana	42
Figura 5 Via de síntese da galactomanana em endosperma de leguminosas	45
Figura 6 Fluxograma de extração dos polissacarídeos endospérmicos	65
Figura 7 Vagens verdes e quiescentes de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	74
Figura 8 Evolução do desenvolvimento da semente de <i>C. pulcherrima</i>	76
Figura 9 Curva de massa fresca e massa seca da semente	79
Figura 10 Curva de massa fresca e massa seca do tegumento	81
Figura 11 Curva de massa fresca e massa seca do endosperma	83
Figura 12 Curva de massa fresca e massa seca dos cotilédones	85
Figura 13 Teores de cinza, proteína total, lipídio e carboidrato total do endosperma	89
Figura 14 Teores de cinza, proteína total, lipídio e carboidrato total dos cotilédones	92
Figura 15 Corte transversal da semente no 39º DAF corada com AT	95
Figura 16 Corte transversal da semente no 25º DAF corada com AT	96
Figura 17 Corte transversal da semente no 29º DAF corada com AT	96
Figura 18 Corte transversal da semente no 25º DAF submetida à reação do PAS....	97
Figura 19 Corte transversal da semente no 29º DAF submetida à reação do PAS....	97
Figura 20 Corte transversal da semente no 49º DAF submetida à reação PAS	98
Figura 21 Corte transversal da semente quiescente submetida à reação PAS.....	98
Figura 22 Corte transversal da semente no 49º DAF corada com AT	99
Figura 23 Corte transversal da semente no 49º DAF corada com XP.....	99
Figura 24 Corte transversal da semente no 29º DAF corada com XP	100
Figura 25 Corte transversal da semente no 39º DAF corada com XP	100

Figura 26	Corte transversal da semente no 41° DAF corada com XP	101
Figura 27	Corte transversal da semente quiescente corada com XP.....	101
Figura 28	Polissacarídeos obtidos do endosperma em desenvolvimento	104
Figura 29	Cromatografia em camada delgada (CCD)	107
Figura 30	Cromatografia de permeação em gel (GPC)	108
Figura 31	Mw e viscosidade intrínseca $[\eta]$ das galactomananas	110
Figura 32	Determinação das viscosidades intrínsecas das galactomananas	113
Figura 33	Constante de Huggins (K_H) e índice de polidispersidade	117
Figura 34	(A)-Espectro no infravermelho da galactomanana do 25° DAF	118
	(B)-Espectro no infravermelho da galactomanana do 35° e 39° DAF.....	119
	(C)-Espectro no infravermelho da galactomanana do 47° DAF e semente quiescente	120
Figura 35	Curva de atividade α -galactosidásica	123
Figura 36	Cromatografia de afinidade em coluna de goma endospermica de <i>C. pulcherrima</i> contra extrato total de <i>Artocarpus incisa</i>	125
Figura 37	Cromatografia de afinidade em coluna de goma endospermica de <i>C. pulcherrima</i> contra extrato total de <i>Artocarpus integrifolia</i>	127
Figura 38	Capacidade de retenção da frutalina (A) e jacalina (B), em diferentes matrizes de galactomanana e proporção M/G	129
Figura 39	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β - mercaptoetanol das frações não retidas (PI) e retidas (PII) de extrato total de <i>Artocarpus incisa</i>	131
Figura 40	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β - mercaptoetanol das frações não retidas (PI) e retidas (PII) de extrato total de <i>Artocarpus integrifolia</i>	132

LISTA DE TABELAS

	pg
Tabela 1 Gomas utilizadas na indústria e pesquisa científica	04
Tabela 2 Aplicações industriais de gomas exsudadas	06
Tabela 3 Algumas características dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) e sua ocorrência	30
Tabela 4 Alguns usos de lectinas como ferramentas biotecnológicas	53
Tabela 5 Medidas do crescimento da semente de <i>C. pulcherrima</i>	75
Tabela 6 Massa fresca e massa seca da semente	78
Tabela 7 Massa fresca e massa seca do tegumento	80
Tabela 8 Massa fresca e massa seca do endosperma	82
Tabela 9 Massa fresca e massa seca dos cotilédones	84
Tabela 10 Teores de cinza, proteína total, lipídio e carboidrato total do endosperma em desenvolvimento	88
Tabela 11 Teores de cinza, proteína total, lipídio e carboidrato total dos cotilédones em desenvolvimento	91
Tabela 12 Polissacarídeos obtidos do endosperma em desenvolvimento.....	103
Tabela 13 Mw, Mn e Mw/Mn das galactomananas.....	109
Tabela 14 Parâmetros físico-químicos das galactomananas	116
Tabela 15 Proteína solúvel e atividade α -galactosidásica	122
Capacidade de retenção das lectinas de <i>A. incisa</i> e <i>A. integrifolia</i> em coluna de goma endospermica da semente de <i>C. pulcherrima</i> em desenvolvimento	128

RESUMO

A biossíntese da galactomanana e dos demais constituintes da semente de *Caesalpinia pulcherrima* foi acompanhada durante o processo de maturação.

As flôres foram datadas no dia de sua abertura ou florescimento. As vagens foram coletadas a intervalos de tempo regulares, abertas e separadas em tegumento, endosperma e cotilédones. As coletas continuaram até a completa maturação da semente, o que ocorreu entre o 45° e 49° dias após o florescimento (DAF). A galactomanana é o principal polissacarídeo de reserva de parede celular do endosperma compreendendo 81% dos carboidratos totais.

A biossíntese da galactomanana é um processo contínuo que ocorre ao longo de todo o desenvolvimento da semente. Na fase inicial da deposição, esta apresenta uma massa molar de $7,0 \times 10^3$ g/mol (25 DAF) e na fase final do processo a galactomanana apresenta uma massa molar $2,3 \times 10^5$ g/mol (49 DAF). A síntese contínua da galactomanana também foi acompanhada pelo aumento na viscosidade intrínseca, que é influenciada diretamente pelo crescimento da cadeia de manana. Interações intermoleculares podem também ocorrer ao final do processo, conforme demonstrado pelo aumento do coeficiente de Huggins (K_H), que podem estar favorecidas pelo aumento da proporção manose/galactose (M/G) que ocorre a partir do 35°DAF até o final do processo de maturação. O aumento da relação entre os monossacarídeos constituintes está relacionado com o aumento na atividade da α -galactosidase detectada nos extratos enzimáticos do endosperma.

Por cromatografia de permeação em gel, as galactomananas apresentaram uma ampla distribuição de massa molar que permanece ao longo de todo o processo, mesmo com o índice de polidispersidade próximo de 1. Observou-se um aumento brusco na síntese da galactomanana entre o 29° e o 35° DAF, seguido de uma diminuição na velocidade de síntese, com a galactomanana apresentando uma massa molar próxima da semente madura.

Modificações estruturais nas galactomananas durante sua deposição, foram acompanhadas através da interação com lectinas galactose-ligantes, através de cromatografias de afinidade. As matrizes cromatográficas, obtidas após reticulação da galactomanana, foram capazes de reter as lectinas de *Artocarpus incisa* (frutalina) e *Artocarpus integrifolia* (jacalina), conforme comprovado pela visualização de suas bandas protéicas características em SDS-PAGE. As matrizes do 25°, 29° e 35° DAF apresentaram uma capacidade de retenção maior quando comparadas com as matrizes do 35°, 39° e 49° DAF. Esta diminuição pode estar relacionada com o aumento da proporção M/G observada nesses dias. A redução de unidades galactosil na cadeia de manana, seria a responsável pela diminuição na capacidade de ligação às lectinas. A recuperação dessa capacidade observada ao final do processo (45° e 49° DAF) pode ser devida a uma mudança na estrutura fina da galactomanana, possibilitando uma melhor interação entre o sítio de ligação a carboidrato da lectina e a galactomanana.

ABSTRACT

The behavior of the endospermic gum from *Caesalpinia pulcherrima* seed and its chemical composition was investigated during the maturation process. The flowers appeared 150 days after germination. The pods were collected in 2 days intervals until complete maturation and separated in three parts: seed coat, endosperm and cotyledons. *Caesalpinia pulcherrima* seed development can be divided into three stages. During early embryogenesis (i.e. morphogenesis), seed weight and chemical constituents were low. In the second stage, or maturation phase, a rapid increase in seed dry weight was observed and storage lipids, protein and carbohydrate were accumulated in large quantities with carbohydrate accounting for approximately 96% of endosperm dry matter. The other observations was that starch is transiently accumulated in the seed coat of developing seed (25th -35th daf). During the third and last stage (late maturation including acquisition of desiccation tolerance), seed dry weight remained constant while an acute loss of water took place in the seed and storage compound synthesis ended.

Galactomannans are located in the endospermic tissues, where they are deposited in sites of considerable enlargement of cell walls and sometimes fully replace the live protoplast of the cell. Endosperm can account for up to 40-46% of the seed weight, and this percentage is directly correlated to the contents of galactomannan (81% of the seed dry weight).

The *C. pulcherrima* endospermic gum was purified and the galactomannan isolated were analyzed by gel permeation chromatography. In all samples it was observed a single relatively broad peak, which would result from a polydisperse population of molecules with a high molecular size in solution. The abrupt increase of molecular weight (M_w) was observed at 29th to 35th daf ($2.8 \times 10^4 - 1.8 \times 10^5$ g/mol). This can be justified due the greater galactomannan synthesis that occurs at the early of seed maturation and between 39th to 49th daf a increase in galactomannan molecular weight was discreet. During the seed maturation the $[\eta]$ and K_H increase while the degree of polydispersion (M_w/M_n) decreases, indicating that in the early stages (25th daf) many polysaccharides are formed with different molecular masses and later the polysaccharides present a homogeneous and a high molecular mass and, consequently, a high degree of aggregation.

The galactomannan at the earliest stages of deposition had a Man/Gal ratio of about 3. During late deposition this ratio increases, rapidly, stabilizing at about 3.7, the characteristic ratio of the mature seed. The levels of α -galactosidase in the developing endosperms was low during early galactomannan deposition, but increased subsequently, peaking during late galactomannan deposition (49th daf). The developmental patterns of the α -galactosidase activity and of the increase in Man/Gal ratio of the *C. pulcherrima* galactomannan were closely similar, indicating a cause-and effect relationship. Probably, the final Man/Gal ratio in the mature seed is, to an appreciable extent, the result of galactose removal from the primary biosynthetic product by an α -galactosidase activity which is present in the endosperm during late galactomannan deposition. Affinity chromatography were realized in different *C. pulcherrima* gum columns, treated with epichlorhydrin for the formation of cross linkages between the polysaccharides chains. Then, they were tested for the isolation of galactose specific lectins and to investigate possible modifications on fine structure that occurs during galactomannan deposition. Affinity columns obtained at 25th, 29th and 35th daf showed a higher capacity of lectin-binding when compared with the columns of 39th, 45th and 49th daf. This may be due the increase in Man/Gal ratio observed in this period that possibly affect the galactomannan fine structure and thus the interaction lectin-carbohydrate was altered too.

1. INTRODUÇÃO

1.1-Considerações Gerais

Os polissacarídeos e os glicoconjugados ocorrem amplamente na natureza e apresentam diferentes funções, como estrutural, reserva e proteção. Desempenham, ainda, papéis em vários processos biológicos como infecção e certas patologias; na imunológica do sangue e no reconhecimento e adesão celular; como receptores ou sinalizadores (DWEK, 1996). A função biológica destas moléculas bem como suas propriedades físico-químicas são determinadas pela estrutura primária, ou seja, a seqüência de monossacarídeos que compõe um oligossacarídeo ou polissacarídeo, configuração e posição das ligações glicosídicas e tamanho e configuração do anel. É fundamental também seu comportamento conformacional (BRANT, 1980).

O estudo da estrutura de polissacarídeos e oligossacarídeos envolve várias etapas, desde o isolamento à determinação da relação dos monossacarídeos constituintes, anomericidade, tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação, natureza, quantidade e localização de agliconas substituintes. As etapas de extração e purificação são de fundamental importância, pois o material deve ser obtido em forma quimicamente pura, homogênea e com o melhor rendimento possível. Modificações estruturais durante estes processos podem ocorrer. Desta forma, a determinação da estrutura de polissacarídeos requer a utilização de métodos químicos tradicionais como hidrólises, análise de metilação, oxidação com periodato de sódio (HAKOMORI, 1964; HIRST & PERCIVAL, 1965; CIUCANU & KEREK, 1984; CIUCANU & LUCA, 1990; ANUMULA & TAYLOR, 1992), entre outras, e de técnicas específicas para determinação de substituintes como grupos *O*-acetílicos, *O*-metílicos e ácidos urônicos (BLUMENKRANTZ & ASBOE, 1973), sulfatos, (DODGSON, 1961). Paralelamente aos métodos químicos para a determinação da estrutura química fina de carboidratos é de fundamental importância a utilização de técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) em uma e duas dimensões.

Os polissacarídeos solúveis em água são largamente aplicados na indústria devido as suas propriedades funcionais e a otimização de seu uso depende de métodos que permitam prever a relação entre a estrutura e a função destes polímeros (DEA, 1987). Entre os métodos físico-químicos adotados para tal, estão as técnicas reológicas. Atualmente a reologia ou

ciência do fluxo vem sendo aplicada no controle de processos industriais que utilizam biopolímeros como matéria prima. Seu estudo pode contribuir para a melhoria da qualidade do produto final (BERRIAUD *et al.*, 1994; LAPASIN *et al.*, 1995).

Os carboidratos de plantas nativas e/ou cultivadas no Nordeste vêm sendo amplamente estudados no Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados (LABLEC) e tiveram início com o estudo de polissacarídeos endospermicos de *Adenantha pavonina*, (TAVARES, 1998; MOREIRA *et al.*, 1998). A goma de *Adenantha pavonina* (carolina) apresenta uma composição clássica das galactomananas, sendo basicamente constituída por uma galactomanana com uma cadeia principal formada por unidades de D-manopirranose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4) apresentando ramificações de unidades D-galactopirranose unidas por ligações α -(1 \rightarrow 6), com relação manose/galactose de 1,8:1. Esta galactomanana, após reticulação com epiclorigrina, formam um gel que foi utilizado como matriz de afinidade para o isolamento de lectinas D-galactose-ligantes.

As gomas endospermicas de *Schizolobium parahybae* e *Delonix regia* (MATOS, 2000) *Parkinsonia aculeata* (GARROS-ROSA, 2000) *Caesalpinea puclherrima* (BRAGA, 2001), a goma cotiledonária de *Mucuna sloanei* (TEIXEIRA, 2005) e as gomas exsudadas de *Spondias purpurea* (TEIXEIRA, 2001) e de *Anacardium occidentale* (LIMA, 2002) foram também caracterizadas e por tratamento com epiclorigrina, formam géis que podem ser utilizados como matrizes para o isolamento de lectinas galactose-ligantes.

É interessante notar que estas gomas, embora sejam todas capazes de reter lectinas galactose-ligante, apresentam especificidades finas, o que nos fornece uma ferramenta biotecnológica potente para identificar as características próprias de lectinas que, embora nominalmente apresentem a mesma especificidade por monossacarídeos, apresentam atividades biológicas diferentes.

1.2- Gomas

1.2.1-Definição

O termo goma foi atribuído a um grande número de compostos, incluindo polissacarídeos, terpenos, proteínas e polímeros sintéticos. Atualmente, é mais utilizado para polissacarídeos e seus derivados, que se hidratam em água, fria ou quente, formando soluções viscosas ou dispersões (PAULA, 1995). As gomas naturais são geralmente insolúveis em solventes orgânicos, são hidrofílicas e se decompõem a temperaturas elevadas. São substâncias amorfas e não possuem ponto de fusão característico (MANTELL, 1947). Possuem, em geral, a propriedade de gelificar e são muito utilizadas como espessantes e estabilizantes nas indústrias alimentícia e farmacêutica; são compostas, principalmente, por heteropolissacarídeos complexos contendo, às vezes, compostos protéicos em baixa proporção (CHURMS *et al.*, 1986). Incluem-se nesta categoria, os exsudados de plantas, as gomas de algas e de sementes. Para alguns autores, os amidos e derivados de celulose também podem ser considerados gomas (Tabela 1).

Entre as gomas de origem vegetal, as mais utilizadas industrialmente são as gomas endospermicas. Estas são bastante empregadas na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e na medicina, dentre outras. Portanto, são utilizadas nas tecelagens, na fabricação de papéis, de tintas, de pastas de polimentos, na fabricação de alimentos e na confeitaria. Na farmácia são usadas na preparação de emulsão, mucilagens e pastilhas e na medicina, são utilizadas externamente em aplicações locais como agente anti-resssecamento e internamente, nas inflamações, pela sua ação protetora das mucosas (MANTELL, 1947). Mais especificamente as galactomananas são usadas na fabricação de cápsulas que prolongam a ação de certas drogas; são também usadas como suportes para imobilização de drogas (MISRA & BAWEJA, 1997). Entre os derivados da galactomanana, os sulfatos com atividade anticoagulante apresentam um potencial de uso como um heparinóide, em substituição ao uso da heparina (LIMA *et al.*, 1996; PIRES *et al.*, 2001).

TABELA 1 - Gomas utilizadas na indústria e pesquisa científica.

Tipo	Origem	Goma	Nome botânico	
Natural (extração e/ou purificação)	Exsudados vegetais	Goma Arábica	(<i>Acacia</i>)	
		Goma Talha	(<i>Acacia seyal</i>)	
		Goma de Angico	(<i>Anadenanthera macrocarpa</i>)	
		Goma de Cajueiro	(<i>Anacardium occidentale</i>)	
		Goma Gati	(<i>Anogeissus latifolia</i>)	
		Goma Caraia	(<i>Sterculia urens</i>)	
		Goma Tragacante	(<i>Astragalus gummifer</i>)	
		Goma Chichá	(<i>Sterculia striata</i>)	
		Goma Cajá	(<i>Spondias mombim</i>)	
		Sementes	Goma de Guar	(<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>)
	Goma de Alfarroba		(<i>Ceratonia siliqua</i>)	
	Goma de Algaroba		(<i>Prosopis juliflora</i>)	
	Goma Tara		(<i>Caesalpinia spinosae</i>)	
	Goma Fenugreek		(<i>Trigonella-foenum-graecum</i>)	
	Goma de Tamarindo		(<i>Tamarindus indica</i>)	
	Goma de Marmeleiro		(<i>Croton</i>)	
	Goma de Jatobá		(<i>Hymenaea courbaril</i>)	
	Goma de Carolina		(<i>Adenanthera pavonina</i>)	
	Goma de Turco		(<i>Parkinsonia aculeata</i>)	
	Goma de flamboyant		(<i>Delonix regia</i>)	
	Goma de flamboianzinho		(<i>Caesalpinia pulcherrima</i>)	
	Modificada		Frutos (polpa)	Pectina
		Algas	Ágar	(Rodophyceae)
Carragenana			(Cryptonemiales)	
Alginato			(Phaeophyceae)	
Microrganismos		Dextrana	(<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	
		Xantana	(<i>Xantomonas campestris</i>)	
		Gelana	(<i>Pseudomonas elodea</i>)	
Sintéticas	Celulose	Carboxi-metilcelulose		
		Hidroximetilcelulose		
		Hidroxi-etilcelulose		
		Amido	Xantato de amilose	
			Dextrina	
	Hidroxi-etil-amido			
	Acetato de amido			
	Carboxi-metil-amido			
	Guar Alginato	Hidropropilamido		
		Carboximetilguar		
Alginato de propileno glicol				
Alcool polivinílico e				
Poliacrílico;Poliacrilamida				
	Polióxido de etileno			

Fonte: PAULA, 1990.

Do ponto de vista estrutural, as gomas apresentam cadeias lineares ou ramificadas compostas de unidade glicosídicas, podendo apresentar de cem a mil unidades. Ao contrário do amido e da celulose, que são homoglicanas, compostos por apenas um tipo de unidade de açúcar, a glucose, as gomas são heteroglicanas, constituídas por mais de um tipo de açúcar.

1.2.2-Classificação

(i)-Gomas de algas

A maioria das gomas de algas, como é o caso do ágar, dos alginatos e da carragenana pode ser extraída dos tecidos com água quente, ácido diluído ou álcalis. O ágar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas da classe Rodophyceae, é insolúvel em água fria e bastante solúvel em água quente. O ágar é um dos agentes capazes de formar gel mais usado. A baixas concentrações, apresenta alta resistência e reversibilidade. Na indústria alimentícia o ágar é usado como estabilizante e em laboratório é corriqueiramente usado como suporte em técnicas de eletroforese, imuno eletroforese, imunodifusão e filtração em gel.

(ii)-Gomas microbiológicas

Diferentemente das gomas descritas anteriormente, as gomas de origem microbiológica não estão sujeitas a alterações estruturais dependentes do clima, poluição ou localização geográfica (KENNEDY & WHITE, 1988). Através do controle da composição do meio de cultura das bactérias fermentadoras pode se desenvolver polissacarídeos com estruturas e propriedades específicas. As gomas dextrana e xantana são exemplo deste grupo (Tabela 2).

Quimicamente, as dextranas são neutras, constituídas de cadeias de α -D-glucopiranoose, geralmente através de ligações α -(1 \rightarrow 6), tendo algumas ramificações que formam ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) (KENNEDY & WHITE, 1988).

As dextranas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia como estabilizantes. Em laboratório de pesquisa são intensamente empregadas em técnicas cromatográficas tipo filtração em gel (PHARMACIA, 1993) e afinidade para isolar lectinas específicas por glucose (MOREIRA *et al.*, 1991).

(iii)-Gomas exsudadas

Várias famílias de plantas incluem espécies que produzem exsudados gomosos, destacando-se as *Leguminosae*, *Combretaceae*, *Proteaceae* e *Anacardiaceae*. Estes exsudados são principalmente produzidos em galhos e no caule das plantas em resposta a agressões externas tais como, ferimentos ou doenças.

Estruturalmente as gomas exsudadas podem ser divididas em três categorias. A primeira delas é composta de polímeros com cadeia principal de β -galactose (1 \rightarrow 3), com algumas cadeias laterais de galactose (1 \rightarrow 6), ácido urônico e arabinose (ex. goma arábica). A segunda categoria possui uma cadeia principal de ácido glucurônico (1 \rightarrow 2) e manose (1 \rightarrow 4) e cadeias laterais de arabinose, galactose e ácido glucurônico (ex. goma ghatti). A terceira possui uma cadeia de ácido glucurônico (1 \rightarrow 4) ou ácido glucurônico ligada a ramnose e ramificações de ácido glucurônico e seu metil derivativo ou galactose (ex. goma tragacante).

Vários polissacarídeos obtidos de gomas exsudadas têm sido explorados comercialmente (WHISTLER, 1993), incluindo goma arábica (*Acacia senegal* e *Acacia seyal*), goma ghati (*Anogeissus latifolia*), goma tragacante (*Astragalus gummifer*) e goma caraia (*Sterculia urens*), sendo a goma arábica a mais utilizada (Tabela 2).

TABELA 2—Aplicações industriais de gomas exsudadas

Goma	Espécie	Aplicação
Arábica	<i>Acacia senegal</i>	Estabilizador coloidal, adesivo, estabilizador de emulsões
Ghati	<i>Anogeissus latifolis</i>	Estabilizador coloidal, adesivo, estabilizador de emulsões
Caraia	<i>Sterculia urens</i>	Espessante
Tragacante	<i>Astragalus sp</i>	Formador de filmes e géis, espessante

(WHISTLER, 1993)

(iv)-Gomas de sementes

Algumas sementes, principalmente de leguminosas, contêm um endosperma gomoso, cuja principal função seria a de absorver água, em quantidade de até 10 vezes superior ao seu peso, aparentemente destinado à defesa das plantas jovens contra o estresse hídrico. Esta, é uma das prováveis funções atribuídas às gomas presentes nas sementes (gomas endospérmicas), tão importantes, que asseguram o estabelecimento da plântula vegetal (ASPINALL, 1982). A leguminosa *Ceratonia siliqua* apresenta um teor de 38% de galactomanana na semente. Sabe-se que algumas apresentam quantidade de endosperma superior a 50%. Este é um dado que varia de acordo com a espécie (DEA & MORRISON, 1975).

As gomas endospérmicas mais comercializadas, atualmente, são as de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma de guar), *Ceratonia siliqua* (goma de caroba ou alfarroba) e *Caesalpinia spinosae* (goma tara), todas estruturalmente representadas por galactomananas. Desde 1953 a galactomanana de guar, predomina no mercado destes polissacarídeos.

Diversas sementes tiveram suas gomas endospérmicas investigadas estruturalmente e todas mostraram ser basicamente constituídas de galactose e manose em diferentes proporções, tais como: *Mimosa scabrella* (GANTER *et al.*, 1992), *Schizolobium parahybum* (ZAWADZKI-BAGGIO *et al.*, 1992), *Schizolobium amazonicum* (GANTER *et al.*, 1995), *Stryphnodendron barbatiman* (REICHER *et al.*, 1991 & 1992), *Caesalpinia pulcherrima* (UNRAU & CHOY, 1970).

1.2.3-Modificação química das gomas

Os polissacarídeos naturais são todos altamente hidroxilados, usualmente com três grupos hidroxílicos livres por cada unidade na cadeia. Isto facilita o uso de agentes de formação de ligações cruzadas como a epiclorigrina, vinilsulfona, o diisotiocianato e alguns diepóxidos e diolefinas. Modificações químicas nos polissacarídeos neutros são usadas para alterar as propriedades químicas e físicas, possibilitando novas aplicações (WHISTLER & MILLER, 1993).

Para aplicação de gomas naturais em colunas cromatográficas é indispensável a formação de uma malha, para se ter a formação de um gel com resistência mecânica apropriada. Assim, o polissacarídeo precisa ser estabilizado através de ligações cruzadas. Um dos reagentes responsáveis pela obtenção dessas ligações cruzadas é a epiclorigrina. Um

exemplo de reação de epícloridrina com polissacarídeo é a formação do gel de Sephadex (FLODIN, 1962).

Quando o polissacarídeo é misturado com uma solução alcalina de epícloridrina, ocorre uma reação endotérmica e as cadeias do polissacarídeo são ligadas por pontes glicérol 1-3 éter. A epícloridrina reage com dois grupos hidroxila de duas cadeias diferentes.

Uma série de reações laterais pode ocorrer com a epícloridrina sendo hidrolisada em solução aquosa, o cloro removido e o epoxi monofuncional esterificando apenas um grupo hidroxila. Esta hidrólise também pode ocorrer após a epícloridrina ter reagido com o polissacarídeo. Isto resulta em apenas uma substituição pelo glicérol e a ligação cruzada não é formada. A propriedade de intumescimento do gel formado é influenciada pela concentração da dextrana, sua massa molar e a relação massa dextrana-epícloridrina.

A reação ocorre por adição de epícloridrina a uma solução alcalina de dextrana e aquecimento a 40 °C (24h) e a 70 °C (12h). O gel quebradiço obtido é então macerado em água e a alcalinidade neutralizada com HCl. Os fragmentos finos são então, removidos por decantação. Produtos solúveis de reação são removidos por lavagem com água destilada. O gel é então desidratado com etanol e seco em estufa, a 70 °C, sob vácuo. O rendimento do gel mostra um ganho de água variável, conforme a relação dextrana-epícloridrina (FLODIN, 1962).

O primeiro estudo de formação de ligações cruzadas de glicérol éter, com gomas naturais, foi desenvolvido por Fugita *et al.* (1975) usando goma arábica como substrato. Para testar a eficiência do método, uma cromatografia de afinidade foi desenvolvida usando um filtrado de cultura de *Streptomyces sp.* contendo uma lectina específica por galactose. À goma arábica insolubilizada, foi adicionado o filtrado de cultura e a mistura deixada em agitação por uma noite, a frio. O gel foi então empacotado em uma coluna e depois das proteínas não retidas terem sido eluídas, a lectina foi retirada com uma solução de galactose.

Procedimento semelhante foi desenvolvido por Appukuttan *et al.* (1977) para a goma de guar, onde a epícloridrina, aplicada em baixas concentrações, resulta em um gel altamente insolúvel (WHISTLER & MILLER, 1993). A eficiência do método foi testada em uma cromatografia de afinidade, usando uma fração protéica de *Ricinus communis*, rica em lectina. A fração, dissolvida em PBS, foi aplicada à uma coluna de goma de guar, equilibrada com a mesma solução. A seguir a coluna foi lavada com PBS, para retirar as proteínas não retidas. As lectinas retidas foram então eluídas com uma solução 0,1 M de lactose (APPUKUTTAN *et al.* 1977).

Recentemente, a goma endospermica de *Adenanthera pavonina* L. (carolina) reticulada com epiclorigrina foi empregada como suporte na cromatografia de afinidade, para isolar as lectinas ligantes de galactose de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Vaitarea macrocarpa*, *Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus*. Esta matriz apresentou um grau significativo de resolução, na separação de moléculas (TAVARES, 1998).

1.3- Sementes

Dentre as plantas produtoras de sementes, destacamos dois grandes grupos: o das gimnospermas e o das angiospermas, as quais apresentam suas sementes dentro de estruturas chamadas frutos. A nova planta, formada por reprodução sexuada, tem início com um embrião, dentro da semente em desenvolvimento. Esta, por sua vez, desenvolve-se do óvulo fecundado e, quando madura é a principal forma de dispersão natural da espécie. A semente portanto, ocupa uma posição crítica na história de vida das plantas superiores. O sucesso com o qual o novo indivíduo é estabelecido – o tempo, o ambiente, e o vigor da jovem plântula – é largamente determinado pelas características fisiológicas e bioquímicas da semente. A chave para esse sucesso é a resposta da semente ao ambiente e as reservas que contém, disponíveis para a sustentação da nova planta, durante os estágios iniciais do crescimento, antes de tornar-se um organismo autotrófico e independente (BEWLEY & BLACK, 1994).

As sementes das angiospermas normalmente são constituídas pelo (1) embrião, o resultado da fertilização da célula ovo no saco embrionário, por um dos núcleos espermáticos masculinos do tubo polínico; (2) o endosperma, da fusão de dois núcleos polares do saco embrionário com o outro núcleo espermático do tubo polínico; (3) o perisperma, tecido de reserva, diplóide materno, originário do nucelo, e presente apenas em algumas espécies, por ex., *Beta vulgaris* (beterraba), *Piper nigrum* (pimenta), *Coffea arabica* (café); (4) testa ou tegumento, formado de um ou ambos os integumentos do óvulo (BUCHANAN *et al.*, 2000).

1.3.1-Embrião

Nas plantas com flores, o embrião maduro consiste de dois sistemas primários de órgãos: eixo e cotilédones. Os cotilédones – algumas vezes designados como folhas seminais – são as primeiras folhas ou estruturas foliares do jovem esporófito. Como indicam os termos dicotiledôneo e monocotiledôneo, os embriões das dicotiledôneas possuem dois cotilédones e os das monocotiledôneas possuem apenas um cotilédone. Estes órgãos possuem taxas distintas de desenvolvimento e ambos são compostos de três camadas básicas de tecidos: protoderme, procâmbio e meristema - que irão formar a epiderme, sistema vascular e parênquima, da jovem planta, respectivamente.

Nas duas extremidades do eixo do embrião são encontrados os meristemas apicais do caule e da raiz. No embrião, o meristema apical do caule forma a extremidade do eixo acima (*epi*) dos cotilédones. Em alguns embriões, o *epicótilo* leva um pouco mais de componentes além do meristema apical, ao passo que, em outros, exibe uma ou mais folhas jovens. O epicótilo, juntamente com suas folhas jovens, é denominado de *plúmula*. A porção de um embrião ou plúmula situada entre os cotilédones e a radícula recebe a denominação de *hipocótilo* (*hipo*, abaixo de). Em algumas plantas, a extremidade inferior do eixo do embrião possui características nítidas de raiz, sendo denominada *radícula*. A região do hipocótilo do embrião, contém os meristemas da raiz e caule, que darão origem à planta madura, após a germinação da semente. Ao contrário, os cotilédones são órgãos diferenciados, que acumulam reservas alimentares, para o crescimento e desenvolvimento da plântula, até esta tornar-se fotossinteticamente ativa (BUCHANAN, 2000).

A forma e o tamanho dos embriões com relação as outras estruturas dentro da semente são variáveis. Nas sementes maduras de mono- e dicotiledôneas, com um endosperma bem desenvolvido, os cotilédones apresentam-se delgados e membranosos e servem para absorver as substâncias de reserva do endosperma. Nas sementes que carecem de endosperma, como no girassol, noz, ervilha e feijão, os cotilédones são carnosos e ocupam o maior volume da semente.

1.3.2-Tecidos de reserva de origem não embrionária

As sementes podem ser classificadas como endospérmicas ou não endospérmicas, com relação a presença ou ausência na semente madura, de um endosperma completamente formado. Apesar do endosperma estar presente, algumas sementes são consideradas não endospérmicas, considerando-se que este tecido é consumido, permanecendo apenas o remanescente do que foi formado durante o desenvolvimento. Nesses casos, os cotilédones são a principal fonte de substâncias de reserva. Em outras sementes maduras, os endospermas são espessos e atuam como a principal fonte de reserva, como por ex. cereais, mamona e alfarroba. Nos cereais e em alguns legumes, como por exemplo em *Trigonella foenum-graecum*, a maioria das células endospérmicas não é viva na maturidade, o conteúdo citoplasmático é tomado pelas reservas durante o desenvolvimento. Mas as células da camada externa do endosperma contém um tecido vivo, a camada de aleurona, responsável pela liberação de enzimas para a mobilização de reservas, à partir do endosperma.

O endosperma, além de possuir a função de alimentar o embrião, é o principal tecido de armazenamento de reservas, além de fornecer hormônios para regular o crescimento do embrião (OLSEN, 1998). São atribuídas outras funções ao endosperma, como manutenção do alto potencial osmótico em volta do embrião, suporte mecânico durante o crescimento inicial do embrião, armazenamento de reservas, nutrição, e hormônios que irão atuar na germinação da semente (LOPES & LARKINS, 1993). Em *Arabidopsis*, onde o endosperma não persiste, e os cotilédones atuam como o órgão primário de reserva, o endosperma atua promovendo o crescimento inicial do embrião até que uma quantidade suficiente de reservas sejam armazenadas pelos cotilédones.

1.3.3-Tegumento (testa)

Nas angiospermas o tegumento consiste de várias camadas de tecidos especializados que fornecem proteção ao embrião, atuam na germinação e dispersão das sementes, no fornecimento de nutrientes durante o desenvolvimento da semente (BOESEWINKEL & BOUMAN, 1995; DONGEN *et al.*, 2003), além de atuarem como moduladores na relação entre a semente e o ambiente (SOUZA & MARCOS-FILHO, 2001). Os tecidos do tegumento são oriundos das células dos integumentos do óvulo que diferenciam-se em resposta à

fertilização. Durante o desenvolvimento do tegumento, vários tecidos dos estágios iniciais e intermediários, não estão presentes na semente madura (MILLER *et. al.*, 1999). Na maior parte das leguminosas, o tegumento possui uma camada de epiderme de células paliçádicas ou macroesclereídeos, uma camada sub-epidérmica, formada pelos osteoesclereídeos, poucas camadas de parênquima, e uma camada de aleurona (CORNER, 1951).

Em algumas espécies de plantas, incluindo membros da Família Brassicaceae, Solanaceae, Linaceae e Plantaginaceae, as células epidérmicas do tegumento contém grande quantidade de uma substância de natureza pectínica (mucilagem). Esta mucilagem é liberada quando a semente é colocada em meio aquoso, e possivelmente tem um papel na dispersão e/ou na proteção da plântula durante a embebição e germinação. Em algumas espécies de plantas, como *Arabidopsis*, a fertilização induz as células epidérmicas da camada exterior do integumento do óvulo a se diferenciarem em um tipo de célula especializada, com uma morfologia única e contendo grandes quantidades de polissacarídeos mucilaginosos (pectina). A diferenciação dessas células envolve uma série de eventos altamente regulados incluindo crescimento, morfogênese, biossíntese de mucilagem e secreção, e síntese de parede celular secundária (WESTERN *et al.*, 2000).

1.3.4-Armazenamento de reservas na semente

Cerca de 70% de todo o alimento consumido pelo homem é proveniente diretamente das sementes (principalmente de cereais e de leguminosas), e grande parte do percentual remanescente vêm dos animais, que se alimentam de sementes. Portanto, não é surpresa o grande número de publicações científicas sobre a química, estrutura e a composição nutricional das sementes.

Além dos constituintes normais presentes em todos os tecidos da planta, as sementes contém uma quantidade extra de substâncias estocadas, como uma fonte de reserva de alimento, para o suporte durante o crescimento da plântula. Estas são principalmente carboidratos, lipídios e proteínas. As sementes possuem também outras substâncias sem valor nutricional, ou mesmo tóxicas, tais como alcalóides, lectinas, inibidores de proteinases, fitina e oligossacarídeos da série rafinose.

A composição química das sementes é determinada inicialmente por fatores genéticos, o que conduz a uma grande variação entre as espécies, variedades e cultivares. Algumas

modificações na composição resultam de práticas agronômicas ou por alterações impostas pelo ambiente durante o desenvolvimento da semente e maturação (BEWLEY & BLACK, 1994).

As reservas de alimento estão normalmente depositadas dentro do embrião – normalmente nos cotilédones. No entanto, diferentes reservas podem estar localizadas em diferentes tecidos de reserva, como por ex. em sementes de fenogrego (*Trigonella foenum-graecum*), o endosperma é a fonte exclusiva de carboidratos (galactomanana de parede celular), enquanto que os cotilédones contém proteínas e lipídios. (BEWLEY & BLACK, 1994).

(i)-Carboidratos

Os carboidratos, são a principal substância de armazenamento da maior parte das sementes cultivadas.

O amido é o carboidrato de reserva da maioria das plantas superiores e ocorre como grânulos insolúveis em água fria, apresentando variações no tamanho e forma (2-150 μm de diâmetro). O amido é usualmente estocado em órgãos especializados, tais como, sementes, raízes modificadas (batata-doce, mandioca) ou caules (batata, cebola), podendo ser estocado temporariamente nos cloroplastos, nas folhas, durante o dia quando a taxa de fotossíntese é alta, e então ser degradado à noite e transportado como sacarose através da planta.

O amido é um polímero de glucose, formado por uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina. Amilose é uma longa cadeia linear de unidades de glucose (acima de 1000 resíduos) unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, e corresponde de 20-30% da maior parte do amido. A amilopectina, é 10^2 - 10^3 vezes maior e consiste de muitas cadeias de amilose com pontos de ramificação por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, produzindo um molécula altamente ramificada. Os grânulos de amido são depositados em corpos subcelulares chamados *grãos de amido* (amiloplastos), durante sua síntese e, dependendo da espécie, pode existir de um a muitos grânulos em cada grão (BEWLEY & BLACK, 1994).

Hemiceluloses, são componentes estruturais vitais da parede celular das plantas, e sob esse aspecto não são produtos de reserva para as plantas. Entretanto, em alguns tecidos existe uma produção intensiva de algumas hemiceluloses no interior da parede celular primária, como uma fonte disponível de carboidrato. Algumas dessas hemiceluloses pertencem ao

grupo das mananas, que compreende as *mananas puras*, longas cadeias de polímeros de manose ligados através de ligações $\beta(1\rightarrow4)$, com poucas ramificações de galactose ligadas $\alpha(1\rightarrow6)$, as *glucomananas*, com aproximadamente o mesmo número de ligações $\beta(1\rightarrow4)$ de manose e glucose, as *galactomananas*, possuindo cadeias laterais de glucose ligadas $\alpha(1\rightarrow6)$, na cadeia de manose, e as *galactoglucomananas*, esqueleto de manana e glucose (BEWLEY & BLACK, 1994).

Nas galactomananas, o número de cadeias laterais de galactose afeta a sua consistência e a dureza do endosperma; com as mananas puras, com baixo teor de galactose (as mananas de café contém 2% de galactose) sendo muito duras e, mucilaginosas com um conteúdo de galactose maior. O endosperma de algumas monocotiledôneas (Liliaceae e Iridaceae) contém em suas paredes celulares, glucomananas, no qual uma grande proporção de resíduos manose são substituídos por glucose.

Outras hemiceluloses, as xiloglucanas ou galactoxiloglucanas, são moléculas tipo celulose substituídas, isto é, possuem um esqueleto linear de glucose, ligados $\beta(1\rightarrow4)$ com cadeias laterais de xilose e galactose. São encontradas em paredes celulares de cotilédones de vários membros da família Caesalpinoideae-Leguminosae, como em tamarindo (*Tamarindus indica*) (GIDLEY *et al.*, 1991) e mucunã (*Mucuna sloanei*) (TEIXEIRA, 2005).

Açúcares livres são raramente encontrados como carboidratos de reserva, enquanto que, dissacarídeos (sacarose) e oligossacarídeos (série rafinose) são comumente encontrados no embrião e tecidos de reserva, onde são uma importante fonte de açúcares para a respiração durante a germinação e crescimento da jovem planta

(ii)-Lipídios

A grande maioria das sementes contém quantidades apreciáveis de triacilgliceróis, ésteres de ácidos graxos e glicerol, enquanto que algumas sementes podem conter fosfolipídios, glicolipídios e esteróis. Os triacilgliceróis são insolúveis em água, mas solúveis em uma variedade de solventes orgânicos, incluindo éter, clorofórmio, e benzeno. As reservas de triacilgliceróis são depositadas nas sementes em organelas subcelulares – os oleossomos, e conforme a espécie variam em tamanho (0,2-6 μm de diâmetro). Em sementes com alto teor lipídico, como em endospermas de mamona, os oleossomos ocupam um volume substancial da célula (BEWLEY & BLACK, 1994).

(iii)-Proteínas

De acordo com a classificação de Osborne, as proteínas podem ser divididas em quatro classes com base em sua solubilidade : (1) *albuminas* – solúveis em água e tampões diluídos em pH neutro; (2) *globulinas* – solúveis em soluções salinas mas insolúveis em água; (3) *glutelinas* – solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas; (4) *prolaminas* – solúveis em solução alcoólica (70-90%). Sementes de leguminosas são a segunda mais importante fonte de proteína após os cereais. Nutricionalmente, são deficientes em aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), mas ao contrário dos grãos de cereais, seu conteúdo de lisina é adequado (BEWLEY & BLACK, 1994).

As principais proteínas de reserva são as globulinas, correspondendo a 70% do conteúdo total de nitrogênio em sementes de leguminosas (por ex. ervilha e feijões). As globulinas podem ser divididas em dois grupos, baseado no tamanho e massa, as leguminas 11S e as vicilinas 7S. As vicilinas são proteínas triméricas de Mr 150 kDa-200 kDa, pobres em pontes dissulfeto; seus polipeptídeos constituintes são muito variáveis em tamanho, com M_r entre 12 kDa a 75 kDa (BEWLEY & BLACK, 1994).

A classe mais comum das albuminas de reserva, são as albuminas 2S, amplamente distribuídas em sementes de dicotiledôneas. Algumas albuminas 2S são inibidores das enzimas digestivas α -amilase e tripsina, dessa forma, podendo atuar como um mecanismo de defesa das plantas, contra os insetos predadores (BEWLEY & BLACK, 1994).

1.4-Desenvolvimento da Semente

No ciclo de vida das plantas superiores, o desenvolvimento da semente é um processo chave que conecta duas gerações esporofíticas distintas, sendo portanto, um processo central do ciclo de vida das angiospermas.

1.4.1-Embriogênese e formação dos tecidos de reserva

O processo de desenvolvimento conhecido como embriogênese inicia o desenvolvimento da planta e é iniciado pelo processo de dupla fertilização, levando ao desenvolvimento do embrião e do endosperma. Em plantas diplóides, o embrião desenvolve-

se após a fertilização da célula ovo haplóide por uma das células espermáticas, originando um zigoto diplóide. Em contraste, o desenvolvimento do endosperma triplóide é iniciado quando a célula central homodiplóide é fertilizada por um segundo núcleo espermático. O desenvolvimento simultâneo do embrião e tecido do endosperma, cada um com sua ploidia, ocorre dentro dos tecidos do óvulo materno, envolto pelas camadas esporofíticas diplóides dos integumentos interno e externo. Dessa forma, a interação de diferentes combinações de genomas define o desenvolvimento da semente (CHAUDHURY *et al.*, 2001).

Durante a embriogênese, o corpo da planta é definido por duas populações de células tronco presentes no embrião; os meristemas da raiz e do caule. As principais partes do embrião incluem o meristema apical, hipocótilo, cotilédones, raiz, e meristema da raiz. Um padrão radial é também estabelecido em volta do eixo apical-basal, o qual contém a epiderme na periferia e, camadas de tecidos vasculares e condutivos em seu interior (LAUX & JURGENS, 1997). O plano básico é estabelecido no início do processo e eventos subsequentes incluem posterior crescimento do embrião, diferenciação celular, e a preparação para quiescência.

Na embriogênese em plantas superiores, observa-se padrões básicos de desenvolvimento, que persistem na planta adulta: (i) o eixo apical-basal e os (ii) meristemas, além de definir o (iii) padrão radial dos tecidos, caules e raízes; (iv) diferenciação dos tipos de tecido primários da planta; (v) formação de um órgão especializado de armazenamento, e (vi) permitir que o esporófito entre em dormência, até que surjam condições favoráveis para o desenvolvimento pós-embriônico (BAUD *et al.*, 2002; MEIR & REID, 1977).

A embriogênese é concluída com o período de quiescência. A principal alteração no desenvolvimento embrionário ocorre durante a fase de expansão do órgão e maturação. Uma mudança ocorre durante este período de transição, envolvendo um programa de formação (morfogênese) e diferenciação (histodiferenciação) inicial para um programa de acúmulo de substâncias de reserva, a fim de preparar o jovem esporófito para a dormência do embrião e o desenvolvimento pós-embriônico (BAUD *et al.*, 2002). Os cotilédones e eixo aumentam drasticamente em tamanho, como resultado de divisões celulares e expansão celular. As células do meristema, de ambos os tecidos, tornam-se altamente especializadas, acumulando grandes quantidades de proteínas de reserva e óleos, que serão consumidos como fonte de alimento pela plântula após a germinação (MANSFIELD *et al.*, 1991). Ao final do período de expansão e maturação, o embrião atinge seu tamanho máximo, as células do embrião e, camadas da semente em volta do embrião, tornam-se desidratadas (NEDEVA & NIKILOVA,

1997), ao mesmo tempo em que cessam as atividades metabólicas e um período de quiescência é iniciado dentro da semente (GOLDBERG *et al.*, 1994) (Figura 1).

A semente em desenvolvimento é composta pelo endosperma e tecido embrionário envolto e nutrido pelos tecidos maternos. O desenvolvimento do endosperma é um componente essencial para o desenvolvimento da semente, juntamente com os aspectos genéticos e fisiológicos do embrião, endosperma, e tecidos maternos.

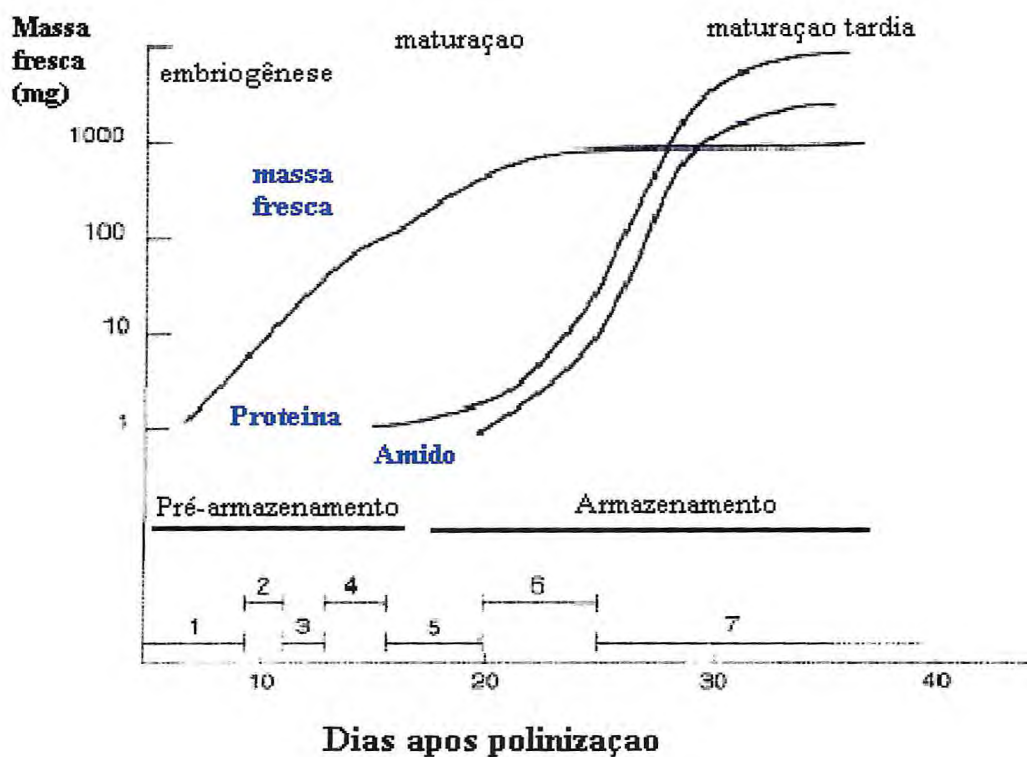


FIGURA 1-Curvas representativas do desenvolvimento da semente de *Vicia faba*. Embriogênese (1-5); maturação (5-7), caracterizada pelo acúmulo de substâncias de reserva e a fase final ou maturação tardia (7) que compreende a fase de desidratação da semente (BORISJUK *et al.*, 1995).

Recentes estudos realizados nas dicotiledôneas e monocotiledôneas, usando como modelo *Arabidopsis* e *Hordeum vulgare* (cevada), indicaram que as etapas básicas no desenvolvimento do endosperma são conservadas entre as mono e dicotiledôneas. A medida que o embrião, adquire a arquitetura básica da planta, o endosperma triplóide desenvolve-se em duas etapas: um estágio cenocítico, celularizado e diferenciado (OLSEN, 2001; CHAUDHURY *et al.*, 2001; BERGER, 1999) antes de ser totalmente reabsorvido durante a maturação. O estágio sincicial é iniciado por sucessivas divisões do núcleo triplóide sem citocinese, originando então, um sincício multinucleado onde o citoplasma é organizado em domínio citoplasmático nuclear (DCN), definido por um sistema de microtúbulo radial (WEBB & GUNNING, 1991; BROWN *et al.* 1996). O citoplasma é então, compartimentalizado em estruturas semelhantes a um tubo, chamado alvéolo (OLSEN *et al.*, 1999). Divisões periclinais no alvéolo conduzem ao processo de citocinese e celularização do endosperma. A celularização do endosperma tem início na região em volta do embrião em desenvolvimento e, em *Arabidopsis*, coincide com o desenvolvimento do cotilédone no embrião (BROWN *et al.*, 1996 & 1999; OLSEN *et al.*, 1999). Após a celularização, as células endospérmicas se diferenciam em endosperma amiláceo, e camada de aleurona, nos cereais.

Estudos realizados em dicotiledôneas, sugerem que os endospermas, além de atuarem na liberação de nutrientes ao embrião, também são uma fonte de sinais para a embriogênese (Van HENGEL *et al.*, 1998), onde ocorrem interações entre o embrião e o endosperma. Análises genéticas sugerem que o tecido materno e endosperma, regulam o desenvolvimento de ambos os tecidos (LOPES & LARKINS, 1993; FELKER *et al.*, 1985; CHAUDHURY *et al.*, 2001).

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento de sementes de leguminosas (não-endospérmicas), os nutrientes requeridos são obtidos do líquido em volta do embrião, referido como secreção nucelar (endosperma). Durante a fase de estocagem, nos cotilédones, o assimilado é translocado a partir da planta-mãe, através da vagem, via tecido vascular para o funículo e integumentos da semente.

Os diferentes órgãos da planta possuem funções e requerimentos bioquímicos diversos, como as folhas que sintetizam moléculas ricas em energia para o transporte de carbono, e os órgãos consumidores, como frutos e sementes em desenvolvimento, raízes e tubérculos, que são dependentes da importação e utilização desses compostos. Na maior parte das espécies, o carbono assimilado é transportado como sacarose, um dissacarídeo no qual glucose e frutose são ligados via ligação glicosídica (KOCH, 2004; STURM & TANG, 1999; WEBER *et al.*, 1997). Em algumas leguminosas, como, por ex., soja (MILLER *et al.*, 1999) e

ervilha (DONGEN *et al.*, 2003), a sacarose translocada produzida pela fotossíntese nas folhas e vagens, pode ser temporariamente estocada como amido, na vagem e tegumento, antes de sua remobilização e transferência para a semente e embrião em desenvolvimento (MILLER *et al.*, 1999).

A clivagem da sacarose que ocorre durante o desenvolvimento da semente, é de vital importância para as plantas multicelulares. As únicas vias enzimáticas de clivagem da sacarose, são catalisadas pelas invertase (sacarose + H₂O → glucose + frutose) e sacarose-sintase (sacarose + UDP → frutose + UDP-glucose). A invertase é uma hidrolase, que cliva a sacarose liberando dois monossacarídeos e a sintase da sacarose uma glicosiltransferase que, na presença de UDP, converte sacarose em UDP-glucose e frutose. Ambas as vias degradam sacarose *in vivo* mas os produtos diferem em seu destino (TYMOWSKA & KREIS, 1998; WINTER & HUBER, 2000). Essas enzimas estão localizadas em diferentes compartimentos subcelulares. As suas atividades regulam a entrada de sacarose em vias metabólicas distintas, como respiração ou biossíntese de polissacarídeos de parede celular e substâncias de armazenamento. Dependendo da via utilizada pela célula para a captação da sacarose (via plasmodesmas ou espaço através da parede celular), a sacarose pode ser clivada por uma invertase localizada na parede celular, no citoplasma ou no vacúolo e pela sacarose-sintase.

Durante a fase de pré-armazenamento, o processo de liberação mediado pela invertase conduz a uma diminuição da proporção sacarose/hexose (BORISJUK *et al.*, 2004). Nesse estágio, os cotilédones possuem uma alta atividade mitótica enquanto que as funções de reserva estão impedidas. A transição da fase de divisão celular para a fase de armazenamento é paralela ao decréscimo na atividade da invertase no tegumento e marcada por um aumento na proporção sacarose/hexose e no acúmulo de biomassa. Em geral as hexoses favorecem a divisão celular e expansão, enquanto que a sacarose está relacionada com o processo de diferenciação e maturação (WOBUS & WEBER, 1999; BORISJUK *et al.*, 2003).

Após a perda da atividade da invertase é iniciada a fase de armazenamento/maturação, que é acompanhada pela formação de um sistema de transporte ativo de sacarose, presente em diferentes partes da semente. Nessa fase, os tecidos apresentam baixo nível de atividade da invertase, e níveis elevados de atividade da sacarose-sintase (QUICK & SCHAFFER, 1996). A enzima pode ser encontrada no citoplasma na forma solúvel (fosforilada) ou fortemente ligada ao complexo da sintase da celulose (desfosforilada) na membrana plasmática (AMOR *et al.*, 1995). Embora a reação catalisada pela sintase da sacarose seja reversível (GEIGENBERGER & STITT, 1993), esta torna-se irreversível devido a rápida remoção dos produtos de clivagem, via atividade da frutoquinase e síntese de amido (QUICK &

SCHAFFER, 1996). Dessa forma, a clivagem da sacarose pela sintase da sacarose está relacionada com processos anabólicos onde UDP-glucose é o precursor para inúmeros compostos.

1.5- Parede celular

A célula vegetal, ou protoplastos, são envoltos por uma cobertura celular bem desenvolvida denominada parede celular, a qual fornece rigidez estrutural, determinando assim, o tamanho e a forma das células vegetais. É uma estrutura dinâmica e altamente complexa, constituída, basicamente por polissacarídeos, destacando-se a celulose e os componentes da matriz (CARPITA & GIBEAUT, 1993).

Nas dicotiledôneas, as paredes são constituídas por 30% de celulose, 30% de hemicelulose, 35% de pectina e 1-5% de proteínas estruturais e, as espécies de gramíneas contém 25% de celulose, 55% de hemicelulose e apenas 10% de pectina. (COSGROVE, 1997).

As células vegetais possuem como constituinte principal em sua parede a celulose, depositada ao longo de sua extensão como microfibrilas semicristalinas, composta por 30 a 36 cadeias de glucana β -D-(1 \rightarrow 4), mantidas juntas ao longo de sua extensão por ligações de hidrogênio, formando um material insolúvel e resistente. As microfibrilas de celulose são interconectadas com moléculas de hemiceluloses de alto peso molecular (xiloglucanas ou arabinoxilanas) através de ligações de hidrogênio à superfície das microfibrilas e embebidas em uma matriz de pectina (CARPITA & GIBEAUT, 1993) (Figura 2).

Hemiceluloses, macromoléculas extraídas da parede celular com álcali formam associações não-covalentes com celulose, na rede xiloglucana-celulose das paredes primárias tipo I (CARPITA & GIBEAUT, 1993). Possuem uma cadeia principal (D-glucana, D-xilana ou D-manana) β -(1 \rightarrow 4), com ramificações curtas, quase sempre com resíduos simples, formando fucogalactoxiloglucana, 4-O-metilglucuronoarabinoxilana e galactomanana. As hemiceluloses constituem cerca de 30% do peso das paredes celulares primárias, apresentando uma proporção maior nas paredes secundárias e quase 100% em algumas células especializadas como as das paredes celulares de sementes, onde os polissacarídeos presentes são mobilizados como reservas de alimento após a germinação. Na parede celular secundária, as principais hemiceluloses descritas são galactoglucomanana, arabino 4-O-

metilglucuronoarabinoxilana (TIMELL, 1965), 4-*O*-metilglucuronoxilana e glucomanana, em menor quantidade (TIMELL, 1964).

Pectina está presente em paredes celulares primárias do tipo I, e refere-se a um termo coletivo para uma fração rica em ácido galacturônico. A pectina mais abundante é a ramnogalacturonana I (RGI), que consiste de uma cadeia principal alternada de ácido galacturônico e ramnose, possuindo vários grupos laterais, principalmente galactanas e arabinanas (RIDLEY *et al.*, 2001). Os outros componentes, são homogalacturonana (HG), xilogalacturonana (XGA) e ramnogalacturonana II (RGII), constituídos por uma cadeia principal de ácido galacturônico em ligações (1→4). Homogalacturonanas são cadeias lineares de ácido α -D-galactopiranosilurônico, com algumas unidades esterificadas com grupos metil ou acetil. Ao contrário, a cadeia principal da xilogalacturonana (XGA) contém ramificações de resíduos de xilose de diferentes comprimentos, dependendo da espécie e tecidos analisados. Ramnogalacturonana II (RGII) é um polissacarídeo relativamente pequeno mas altamente complexo, presente universalmente nas paredes primárias. Está normalmente presente na fração pectínica, embora não faça parte do complexo molecular maior. É constituída por um esqueleto de galacturonana, contendo vinte diferentes monossacarídeos conectados via diferentes ligações glicosídicas (STEVENSON *et al.*, 1988). RG-II também forma complexo com boro, um elemento traço requerido especificamente pelas plantas superiores (O'NEILL *et al.*, 1996).

O alto conteúdo de galacturonato no material pectico resulta em polímeros com cargas negativas, sendo a maior parte neutralizada por íons cálcio, levando a formação de ligações cruzadas entre as moléculas pecticas (JARVIS, 1984).

A composição dos polissacarídeos da matriz é diferente entre as dicotiledôneas e monocotiledôneas, notadamente nas Gramineae (McNEIL *et al.*, 1984), onde observa-se a predominância dos polissacarídeos com ligações mistas (1→3) (1→4)-glucanas e glucuronoarabinoxilanas, que possivelmente desempenham um importante papel na regulação do ciclo de vida e na resposta a sinais do meio ambiente. Por outro lado, nas dicotiledôneas, as xiloglucanas e pectinas encontram-se em maiores quantidades e possuem a capacidade de formar ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose, contribuindo assim, para a construção e organização macromolecular da parede celular. Outros polissacarídeos estão também envolvidos em algumas funções específicas da parede celular.

Outros componentes não-polissacarídicos contribuem para a complexidade e resistência da parede, como as proteínas estruturais, notadamente as extensinas, abundantes

nas dicotiledôneas, onde são inseridas durante o crescimento da parede primária. As extensinas são uma família de glicoproteínas (HRGPs), ricas em hidroxiprolina e serina e algumas combinações dos aminoácidos tirosina, lisina e histidina. Outras proteínas ricas em prolina (PRPs), glicina (GRPs), treonina e as proteínas arabinogalactanas (AGPs) são formadas durante a diferenciação de células específicas (SHOWALTER, 1993).

A composição da parede celular varia significativamente entre um tipo de célula e outra, entre diferentes espécies e em resposta a patógenos, simbiontes e outros fatores patogênicos (RAE *et al.*, 1992; BUCKERIDGE *et al.*, 1995; VORWERK *et al.*, 2004).

As funções fisiológicas das células vegetais são influenciadas pela natureza da parede celular. Durante o desenvolvimento da planta, as propriedades físicas da parede celular são alteradas através de modificações estruturais. Dessa forma, a parede celular tem um papel importante não apenas na regulação do crescimento da planta e na morfogênese, mas também na regulação de outros estágios do ciclo de vida da planta (BRETT & WALDRON, 1996; FRESHOUR *et al.*, 1996; HOSON, 2002).

A parede celular contém muitas enzimas capazes de modificar os polissacarídeos da matriz, como *endoglucanases*, que clivam a cadeia principal de polissacarídeos da matriz; *glicosidases* que removem cadeias laterais, dessa forma permitindo uma maior interação entre cadeias polissacarídicas; *transglicosilases* que quebram ligações entre polissacarídeos e as unem novamente; *esterases* que removem grupos metil de pectinas e clivam ligações ésteres entre cadeias polissacarídicas; e as *peroxidases* que podem formar ou quebrar ligações de compostos fenólicos na parede. Todas essas enzimas possibilitam alterar a estrutura da parede, através da quebra de ligações existentes entre os polissacarídeos, sendo, portanto, responsáveis pela autólise e afrouxamento da parede celular, e assim, modular a expansão celular (FRY, 1995).

Além das enzimas, proteínas da parede com habilidade para induzir a extensão da parede *in vitro*, foram identificadas e nomeadas posteriormente de expansinas (McQUEEN-MASON *et al.*, 1992; COSGROVE, 2001). As expansinas são uma classe multigênica de proteínas que atuam auxiliando a extensão da parede celular durante o crescimento, através do rompimento das ligações de hidrogênio na interface entre os polímeros individuais da parede celular. Estudos prévios têm demonstrado a participação das expansinas em diversos processos, incluindo crescimento celular e polaridade, formação e crescimento da raiz, organogênese e amadurecimento do fruto (ROSE & BENNETT, 1999). Uma vez que tenha alcançado seu tamanho final, a maior parte das células vegetais termina a deposição de

material na parede primária; entretanto, suas paredes permanecem uma estrutura dinâmica sujeita a *turnover* contínuo e eventos de reorganização.

São identificados três estágios durante a formação de uma nova célula vegetal: citocinese, alongação e maturação. Em cada um desses estágios, a parede celular sofre modificações químicas e estruturais. Na citocinese a placa celular em desenvolvimento ou fragmoplasto é formada a partir de vesículas do aparelho de Golgi, crescendo de dentro para fora até se fundir com a parede celular primária pré-existente. O segundo estágio envolve expansão e diferenciação da parede primária, onde após terem atingido seu tamanho, a maior parte das células apresentam poucas mudanças na estrutura da parede (COSGROVE, 1997).

Em alguns tipos de células, a parada do crescimento em extensão é seguido pela deposição de uma parede celular secundária entre a parede primária e a membrana plasmática. Esta é composta em sua maior parte por celulose (40-80%), hemiceluloses (10-40%) e lignina (5-25%) e possui funções mecânicas, por conferir rigidez a determinados tipos de células (COSGROVE, 1997). Paredes secundárias são encontradas na madeira, em tecidos vasculares e algumas vezes em tecidos epidérmicos de plantas herbáceas. Embora os cotilédones e células endospermicas de sementes em desenvolvimento não possuam paredes secundárias verdadeiras, as células acumulam polissacarídeos formando uma camada espessa no espaço periplásmico, na parte interna da parede primária.

A parede celular vegetal possui, além da função estrutural, uma função de proteção e defesa, contra invasão por patógenos, além de atuar regulando o crescimento durante o ciclo de vida da planta. Dessa forma, é necessário que as paredes sejam fortes o suficiente para prevenir o rompimento dos protoplastos sob pressão de turgor. Por outro lado, as paredes de células vegetais em crescimento, necessitam possuir propriedades para o afrouxamento, a fim de permitir um controle da expansão celular (CARPITA & GIBEAUT, 1993).

1.5.1-Parede celular primária

As paredes celulares sintetizadas durante a expansão celular são denominadas paredes primárias e são capazes de afrouxar ou romper-se durante a pressão de turgor (COSGROVE, 1999). Durante o crescimento em extensão, o estiramento da parede existente diminui sua espessura, levando a um enfraquecimento mecânico da mesma. Consequentemente, a inserção de novo material na parede celular deve ser cuidadosamente coordenado com a expansão celular mediada pelo turgor, a fim de manter a integridade da parede.

A celulose é o polissacarídeo vegetal mais abundante, compreendendo entre 15-30% da massa seca das paredes primárias e em maior extensão nas paredes secundárias.

A parede celular primária é formada por microfibrilas de celulose, embebidas em uma matriz composta por aproximadamente dez tipos diferentes de polissacarídeos não-celulósicos e glicoproteínas estruturais, tendo a matriz participação em diversas funções fisiológicas desempenhadas pela parede. As hemiceluloses (xiloglucana, galactomanana, galactanas), presentes nas paredes primárias das dicotiledôneas, são definidas como polissacarídeos que formam ligações cruzadas, não covalentes e fortes com as microfibrilas de celulose, podendo suportar a parede celular primária (FRY, 1989).

(i) Parede celular primária tipo I

A parede celular primária do tipo I, é característica da maior parte das espécies das dicotiledôneas. A fração hemicelulósica normalmente contém xiloglucana como principal componente, correspondendo a 20% do peso seco da parede celular e pequenas quantidades de xilana (Figura 2).

A xiloglucana é constituída por uma cadeia principal de unidades β -D-(1 \rightarrow 4)-glucopiranosil idênticas à celulose, mas consideravelmente menor, com ramificações de xilopiranosil ligados α -(1 \rightarrow 6), arranjados de forma regular ao longo da cadeia, ou seja, três resíduos glucosil ligados a grupos substituintes e o quarto sem substituintes. Dessa forma a cadeia de xiloglucana pode ser considerada como uma série de unidades repetitivas de Glc_4Xil_3 . Essas subunidades podem ser substituídas, com resíduos D-galactopiranosil ligados β -(1 \rightarrow 2) à xilose e, unidades de L-fucopiranosil ligados α -(1 \rightarrow 2) à galactose. O arranjo preciso dos grupos substituintes indica um alto grau de controle metabólico sobre o processo biossintético.

(ii) Parede celular primária tipo II

As frações hemicelulósicas da parede primária do tipo II, são muito ricas em polissacarídeos do tipo xilana. Estão presentes também pequena quantidade de xiloglucana, e uma glucana mista β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) (Figura 2).

A parede celular primária do tipo II encontrada apenas nas gramíneas, é também constituída por microfibrilas de celulose, mas ao contrário da parede do tipo I, o principal polímero que interliga as microfibrilas são as glucuronoarabinoxilanas (GAXs), constituídas por uma cadeia linear de unidades β -D-(1 \rightarrow 4)-xilosil e frequentemente ramificada na posição O-2 com unidades arabinosil terminal e em menor proporção com unidades de ácido glucuronosil. Glucuronoarabinoxilanas são altamente ramificadas em células em divisão e durante a elongação, enquanto que durante a fase de elongação e diferenciação ocorre um acúmulo de GAXs não-ramificada (CARPITA & GIBEAUT, 1993).

Algumas arabinanas presentes em paredes do tipo II de células em divisão, são formadas durante a expansão celular. Ao contrário, novos polímeros de β -D-(1 \rightarrow 4)-glucana ou β -D-(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-glucana são sintetizados ao longo da cadeia de GAX (CARPITA & GIBEAUT, 1993), sendo uma característica da parede celular do tipo II. As glucanas mistas são homopolímeros não-ramificados de glucose, contendo uma mistura de oligômeros lineares β -D-(1 \rightarrow 4)-glucose e β -D-(1 \rightarrow 3)-glucose. A distribuição dos tipos de ligações não ocorre ao acaso. As ligações β - (1 \rightarrow 4) não ocorrem sozinhas, mas em blocos. Esses blocos são separados por ligações β -(1 \rightarrow 3), que ocorrem sozinhas. A molécula é portanto, constituída por uma série de domínios estruturais ligados β -(1 \rightarrow 4) separados por ligações únicas β -(1 \rightarrow 3). A maior parte do bloco estrutural contém dois ou três resíduos de glucose ligados (1 \rightarrow 4), mas uma proporção menor de longos blocos está presente (STONE & CLARKE, 1992).

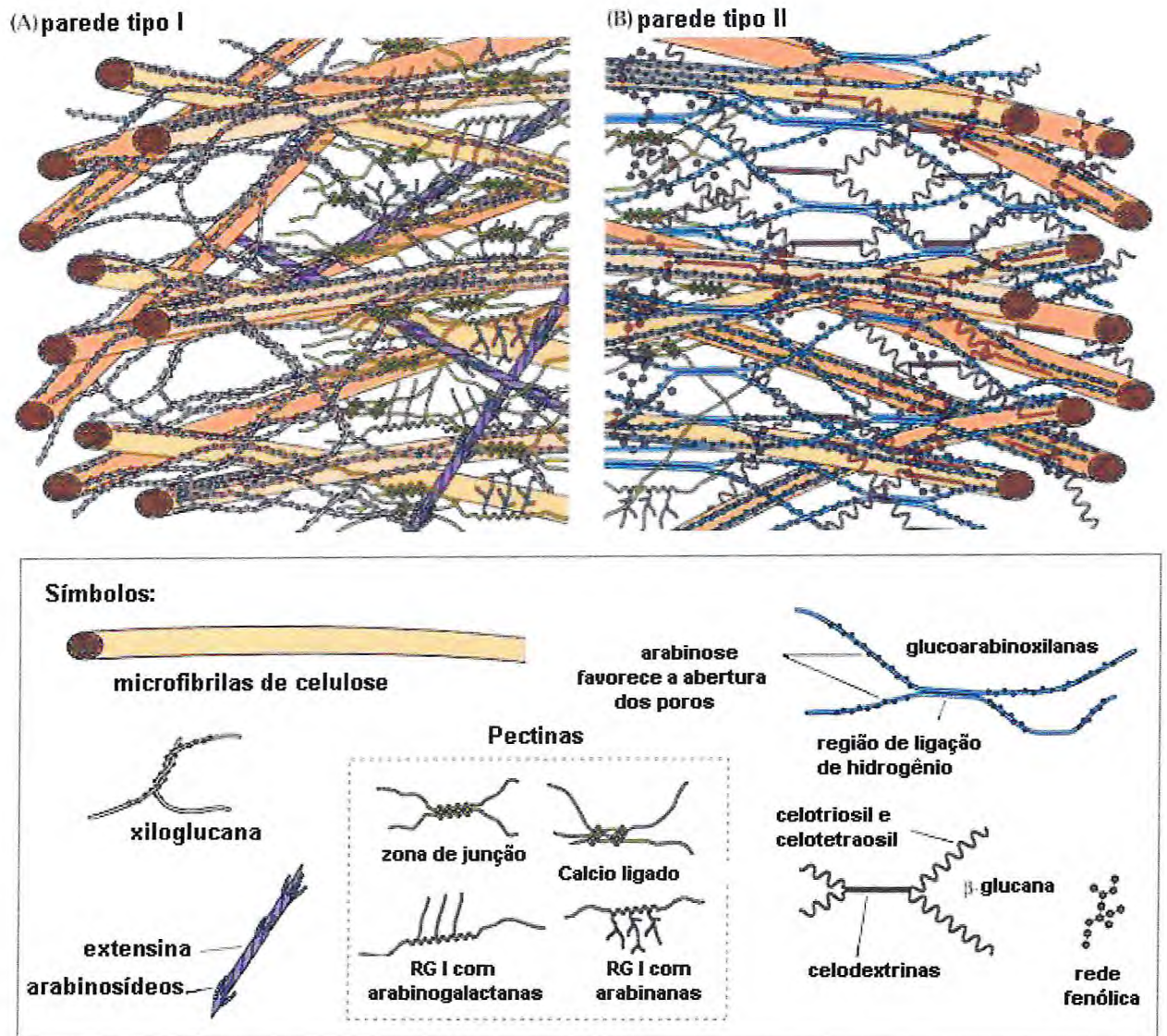


FIGURA 2 -(A) Modelo tridimensional da parede celular primária do tipo I mostrando a interação molecular entre: xiloglucanas, pectinas e proteínas da parede. (B) Modelo tridimensional da parede celular do tipo II mostrando a interação molecular entre celulose, glucoarabinoxilanas, pectinas e substâncias aromáticas. Fonte: BUCHANAN, 2000.

1.5.2- Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular (PRPC)

Os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) são principalmente encontrados em sementes, raízes, rizomas, tubérculos e bulbos.

Muitas sementes possuem em seus tecidos de reserva (endosperma, cotilédones ou perisperma) paredes celulares muito espessas, devido ao acúmulo de grande quantidade de polissacarídeos de reserva, formados pelas células vegetais, em estágios do desenvolvimento, normalmente durante períodos de intensa atividade fotossintética, os quais serão mobilizados durante a germinação. Dentre os PRPC destacam-se três principais grupos: mananas, xiloglucanas e galactanas (BUCKERIDGE *et al.*, 2000) (Tabela 3).

A- Grupo das Xiloglucanas

As xiloglucanas foram detectadas primeiramente em sementes de *Impatiens balsamina*, *Tropaeolum majus* e em *Cyclamen europaeum* (HEINRICHER, 1888; REISS, 1889). Estão presentes em larga quantidade nas paredes celulares de cotilédones de diversas espécies e, são também conhecidas como “amilóides”, uma vez que estas reagem na presença de iodo-iodeto de potássio formando complexos de coloração azulada em ensaios colorimétricos e citoquímicos semelhantes à reação apresentada pelo amido.

As xiloglucanas de sementes são constituídas por uma cadeia principal de β -D-(1 \rightarrow 4)-glucana ramificada com ligações α -(1 \rightarrow 6) por unidades de D-xilopiranosídeos ou β -D-galactopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)-D-xilopiranosídeos onde substituintes são ligados. As xiloglucanas apresentam variações apenas no grau de galactosilação, enquanto que a proporção glucose/xilose é fixa no polímero.

A partir da utilização de uma celulase microbiana, Kooiman (1971) observou que as xiloglucanas de sementes de *Tamarindus indica* eram formadas por unidades de um heptassacarídeo Gl₄:Xil₃, com variações nas substituições das unidades de galactose. Foi sugerido então uma nomenclatura para os blocos estruturais com base na cadeia principal. Glucoses não substituídas são denominadas G; as glucoses ramificadas com xilose são denominadas X e, se a galactose está ligada à xilose, o trissacarídeo é denominado L (FRY *et al.*, 1993).

Em muitas sementes de dicotiledôneas, as xiloglucanas são encontradas como um polissacarídeo de reserva de parede celular secundária (REID, 1985; BUCKERIDGE *et al.*,

2000) e nas paredes primárias de tecidos em crescimento, xiloglucana possui uma função estrutural na orientação das microfibrilas e formação da rede fibrilar da parede. A principal diferença entre os dois grupos de xiloglucana é estrutural. Na xiloglucana de parede celular primária, alguns resíduos β -D-galp podem estar substituído em O-2 por α -D-Fucp (HAYASHI, 1989; HAYASHI & MACLACHLAN, 1984). Alguns autores têm sugerido a contribuição dos resíduos fucosil para o aumento na afinidade de adsorção e na constante de adsorção à celulose (HAYASHI *et al.*, 1994). Outros pesquisadores, no entanto, têm mostrado que o conteúdo elevado de resíduos galactosil e sua distribuição ao longo da cadeia têm afetado o grau de interação com a celulose. A partir de hidrólise enzimática com a celulase, fragmentos de xiloglucana menores que 150 kDa apresentaram uma maior interação com a celulose do que a xiloglucana fucosilada de tamanho equivalente (LIMA & BUCKERIGE, 2001; LIMA *et al.*, 2004).

A função de reserva das xiloglucanas foi primeiramente evidenciada em cotilédones de *Tropaeolum majus* (EDWARDS *et al.*, 1985), que mostrou a participação de quatro hidrolases: endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanase ou xiloglucana endotransglicosilase (XTH), β -galactosidase, α -xilosidase e β -glucosidase. O mecanismo de desmontagem *in vivo* ocorre através das seguintes etapas: primeiramente o polissacarídeo é parcialmente hidrolisado pela XTH (transglicosilação); a seguir certas unidades de galactose dos produtos da ação anterior da XTH (oligossacarídeos) são hidrolisadas pela β -galactosidase e então, os oligossacarídeos remanescentes, no processo final de desmontagem, seriam atacados pelas enzimas α -xilosidase e β -glucosidase, liberando assim os monossacarídeos livres xilose e glucose (ROSE *et al.*, 2002).

TABELA 3-Algumas características dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular e sua ocorrência

Polissacarídeo	Unidade de açúcar na cadeia principal	Unidade de açúcar nas ramificações	Nucleotídeo açúcar necessário para a biossíntese	Enzimas hidrolíticas envolvidas na mobilização	Localização na planta
Manana	Manose	Galactose (raramente)	GDP-manose UDP-galactose	Endo- β -mananase	Sementes (Palmae, café, gergelim)
Glucomanana	Manose e Glucose	Galactose (raramente)	GDP-manose UDP-glucose UDP-galactose	Endo- β -mananase Endo- β -glucanase α -galactosidase	Sementes (alface, tomate), e órgãos subterrâneos (Liliaceae)
Galactomanana	Manose	Galactose	GDP-manose UDP-galactose	Endo- β -mananase α -galactosidase Exo- β -mananase	Sementes (Leguminosae, Convolvulaceae, Annonaceae)
Xiloglucana	Glucose	Xilose, galactose, arabinose	UDP-xilose UDP-galactose UDP-glucose	XET β -galactosidase α -xilosidase β -glucanase β -glucosidase	Sementes (Leguminosae, Tropacolaceae, Myrcinaceae)
Galactana	Galactose	Arabinose	UDP-galactose UDP-arabinose	Exo-galactanase α -arabinosidase	Sementes (leguminosae), café

(BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

B- Grupo das Galactanas

As galactanas foram primeiramente detectadas em 1892 (SCHULZE & STEIGER, 1892), sendo somente caracterizadas como polissacarídeos distintos em 1947 (HIRST *et al.*, 1947) em sementes de lupino (*Lupinus albus*). Após extração alcalina seguido de cromatografia de troca iônica, foram detectados a presença de dois polissacarídeos ácidos constituídos por unidades arabinosil, galactosil e pequenas quantidades de ácido galacturônico (TOMODA & KITAMURA, 1967). Foram encontrados, em sementes de quatro espécies de lupinos, dois tipos de galactanas, um com ligações β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6) e algumas ligações (1 \rightarrow 4) e outro com ligações β -(1 \rightarrow 4), possuindo uma substituição a cada 16-21 unidades por L-arabinofuranose (AL-KAISEY & WILKIE, 1992).

Durante a germinação de *Lupinus luteus* foram detectadas a presença, nos cotilédones, de duas α -arabinosidases e três β -galactosidases (MATHESON & SAINI, 1977). Também em cotilédones de *Lupinus angustifolius* foi isolada uma exo- β -(1 \rightarrow 4)-galactanase (BUCKERIDGE & REID, 1994), uma enzima chave na mobilização de polissacarídeos de reserva de parede em cotilédones de *L. angustifolius* após a germinação. Essa enzima possui alta especificidade para β -(1 \rightarrow 4)-galactanas, o componente estrutural dominante nas paredes de reserva e sua atividade acompanha a mobilização das reservas de polissacarídeo na parede.

C- Grupo das Mananas

Esse grupo é o mais amplamente distribuído e consiste de quatro subfamílias denominadas, glucomananas, galactomananas, galactoglucomananas e mananas lineares contendo menos que 5% de galactose (HEGNAUER & GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

(I)- Glucomananas e Galactoglucomananas

Dentre os PRPC do grupo manana, as glucomananas são as menos estudadas, tendo sido detectadas em algumas sementes de Liliaceae (*Asparagus officinalis* e *Edymion mutans* (GOLDBERG, 1969), *Scilla nonscripta* (THOMPSON & JONES, 1964)) e Iridaceae (*Iris ochroleuca* e *Iris sibirica* (HOUGH & JONES, 1953)).

Glucomananas e galactoglucomananas são constituídas por uma cadeia linear $\beta(1\rightarrow4)$, contendo quantidades iguais de unidades β -glucopiranosil e β -manopiranosil e alguns pontos de ramificação (3-6%) com unidades α -galactopiranosil ligadas (1 \rightarrow 6) (REID, 1985).

(II)- Mananas

As mananas são definidas como mananas “puras” por possuírem 90% ou mais de uma cadeia linear de unidades manopiranosil ligados $\beta(1\rightarrow4)$, com até 10% das unidades substituídas com galactose ligadas $\alpha(1\rightarrow6)$. Acima dessa percentagem as galactomananas tornam-se insolúveis e precipitam rapidamente da solução. Portanto, as mananas são estruturalmente relacionadas às galactomananas, possuindo um número menor de ramificações por unidades galactosil e, dessa forma, são insolúveis em água e apresentam uma interação própria entre elas, levando à formação de uma estrutura cristalina na parede celular. São conhecidos dois tipos de mananas: manana I ou manana A – altamente cristalina, de baixo peso molecular, solúvel em solução aquosa de NaOH 6%, anidra, apresentando morfologia granular e densidade elevada (CHANZY *et al.*, 1987); manana II ou B- apresenta alto peso molecular, menos cristalina, apresenta morfologia microfibrilar, insolúvel em solução aquosa de NaOH, menos densa e apresenta pouco conteúdo de água (ASPINALL, 1959).

As mananas têm sido descritas em tecidos não embrionários (endosperma e perisperma) de monocotiledôneas, como por exemplo em endospermas de Palma (*Phytelephas macrocarpa* e *Phoenix dactylifera*) e dicotiledôneas (REID, 1985). Também foram detectadas em endospermas de *Coffea arabica* (WOLFRON *et al.*, 1961), *Carum carvi* (HOPF & KANDLER, 1977) e *Schizolobium amazonicum*, primeira manana isolada de sementes de leguminosas (PETKOWICZ *et al.*, 2001).

Além da função de reserva, as mananas conferem resistência e dureza às sementes, protegendo-as contra danos mecânicos, mesmo após terem sido expostas a água.

(III)- Galactomananas

(a)-Considerações Gerais

Os polissacarídeos vegetais, especialmente as galactomananas, têm sido alvo de intensas pesquisas, principalmente nas áreas industrial e acadêmica. Esse fato se deve provavelmente, ao papel desempenhado pelas galactomananas nas interações com outros polissacarídeos. Têm sido também proposto a interação de galactomananas com proteínas do leite (PERISSUTTI *et al.*, 2002) e lectinas vegetais (TAVARES, 1998; BRAGA, 2001).

Há centenas de anos atrás, plantas superiores produtoras de mucilagem, contendo galactomananas tiveram seu cultivo iniciado. Uma das mais antigas, inclusive com citações bíblicas, é a árvore caroba ou alfarroba (*Ceratonia siliqua*), originária do leste e do sul da Europa e, posteriormente difundida para outras partes do mundo, como Austrália e Estados Unidos. Esta galactomanana apresenta uma proporção manose:galactose de 3,6:1, e é solúvel em água quente. É comercializada em quatro principais classes, que variam no grau de pureza, e na malha utilizada na produção (DEA & MORRISON, 1975). Vagens e sementes de alfarroba foram amplamente utilizadas na alimentação para animais e homens.

Durante a Segunda Guerra Mundial, o fornecimento de sementes de alfarroba a partir de países do mediterrâneo para os Estados Unidos foi extremamente reduzido, levando então à busca de novas fontes de galactomananas em substituição a goma de carob. Neste período, a goma de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) surgiu como substituto da goma de alfarroba, apresentando também um alto teor de galactomananas, 42%, em seu endosperma.

Cyamopsis tetragonolobus é uma planta nativa da Índia e do Paquistão de considerável importância econômica. Foi introduzida nos Estados Unidos no início do século passado (1903), sendo sua produção em escala comercial iniciada em 1940. É também cultivada na Austrália, na África do Sul e nos Estados Unidos. É uma planta que cresce até 1,2 metros, se assemelha à soja e é de fácil plantação e colheita. A goma de guar está disponível comercialmente em diferentes graus de pureza. A relação manose:galactose 1,04:1 permite que este polissacarídeo seja completamente solúvel em água fria (DEA & MORRISON, 1975).

Os estudos sobre a natureza química desses polissacarídeos tiveram início em 1897, quando Effront investigou um carboidrato presente na mucilagem de alfarroba (*Ceratonia siliqua*). Dois anos mais tarde, Bourquelot e Hérissey (1899) demonstraram que a goma era constituída de 83,5% de D-manose e 16,5% de D-galactose, cuja proporção M/G de 5,0:1 está

próxima aos valores atualmente determinados. À partir do desenvolvimento de novas técnicas, mais de 70 galactomananas tiveram a proporção M/G determinada, tendo sido encontradas variações na proporção M/G de 1:1 para galactomanana de *Medicago sativa* (COURTOIS *et al.*, 1958) e 5,26:1 para a galactomanana de *Sophora japonica* (KOOIMAN, 1971).

As galactomananas são encontradas em sementes de diversas famílias, como: Annonaceae, Compositae, Convolvulaceae, Ebenaceae, Fabaceae, Lagoniaceae, Malvaceae, Palmae, Solanaceae, Tiliaceae, Umbelliferae (DAHAL *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 1997) e Cuscutaceae (LYSHEDE, 1992). Entretanto, é na família Fabaceae onde encontram-se o maior número de galactomananas estudadas, e um conteúdo maior de galactomananas em sementes. Estas são depositadas, em grande quantidade, na parede celular de endosperma de sementes de leguminosas, correspondendo a 40-48% do peso fresco da semente. São constituídas de uma cadeia principal, linear, de unidades β -D-manopiranosil com ligações (1 \rightarrow 4), muitos destes substituídos em O-6 com resíduos α -D-galactopiranosil (DEA & MORRISON, 1975) (Figura 3).

Foi observado que a razão das unidades manose:galactose é dependente da espécie, podendo variar de 1:1 a 5,6:1, podendo as galactomananas serem classificadas em dois grupos: os de elevada concentração de galactose e os de baixa concentração de galactose. Têm sido sugerido que a proporção M/G e a distribuição das unidades de galactose na cadeia de manana, poderia ser usada em estudos quimiotaxonômicos e evolutivos. Em geral, galactomananas com poucas substituições são obtidas de sementes de espécies pertencentes a família mais primitiva Caesalpiniaceae e galactomananas com substituições médias e elevadas pertencem a famílias mais recentes, por exemplo, Fabaceae (REID & EDWARDS, 1995). A razão Man/Gal é responsável por muitas das propriedades apresentadas pelo polímero, como solubilidade e grau de interação com moléculas de celulose na parede celular, bem como interações com outros polímeros.

$\beta\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Man}(1\rightarrow4)$

1
↑
6
 αGal

1
↑
6
 αGal

1
↑
6
 αGal

1
↑
6
 αGal

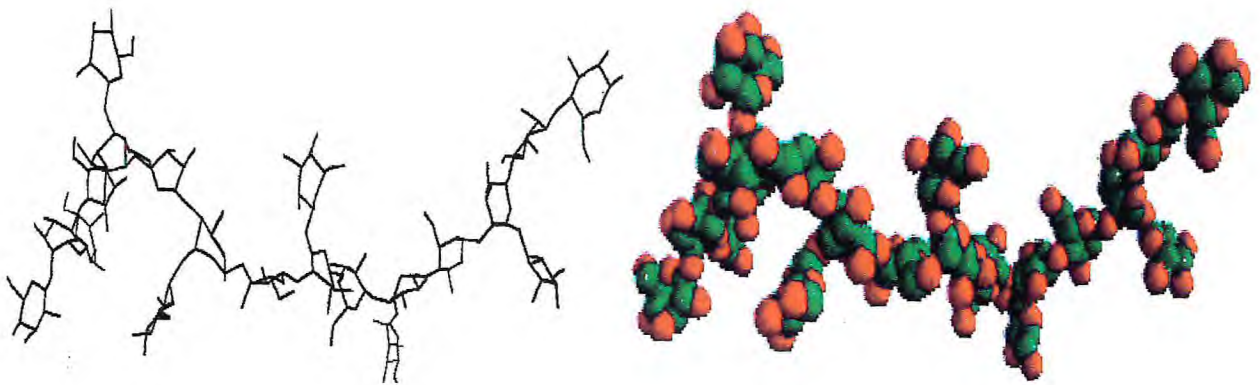


FIGURA 3-Estrutura clássica das galactomananas vegetais.

Devido às suas propriedades em soluções aquosas, formando dispersões viscosas e estáveis absorvendo normalmente grande quantidade de água que, além de distribuir ao redor do embrião, o protege contra a desidratação, as galactomananas possuem uma função de defesa, além de atuarem como substâncias de reserva (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Galactomananas são amplamente usadas na indústria farmacêutica, têxtil, papel, cosméticos e de alimentos (WHISTLER, 1973; DAVIDSON, 1980). O uso dessas gomas está diretamente relacionado as suas propriedades em solução, incluindo suas interações com outras macromoléculas.

(b)- Isolamento e caracterização das galactomananas

A ausência de ligações fortes entre as galactomananas e outros componentes da parede celular, permitem que esta seja facilmente obtida por extração em água. Extrações feitas, com sementes de leguminosas secas e moídas, em água quente ou fria, com solução aquosa de hidróxido de sódio e algumas vezes com ácido acético 1%, sob agitação prolongada, podem ser usadas para obtenção da goma. A porção solúvel da goma é então separada por centrifugação ou filtração, e o polissacarídeo é recuperado por precipitação em etanol. Nesta preparação podem estar presentes outros polímeros e, portanto uma purificação posterior das galactomananas inclui repetidas precipitações com etanol, ou seu isolamento como complexos com íons metálicos divalentes (Cu^{2+} ou Ba^+) ou com reagente de Fehling. Esses metais ligam-se a C-2 e C-3 de unidades manose. O complexo formado, não é solúvel em água, precipitando da solução, sua dissociação é feita usando-se ácido diluído, com a regeneração da galactomanana e, finalmente, faz-se uma reprecipitação com etanol para obtenção da goma pura. A solução de Fehling é um dos reagentes mais usados, embora acetato cúprico e hidróxido de bário também sejam bastante usados para essa finalidade (DEA & MORRISON, 1975).

Podem ser realizadas extrações prévias, da farinha da semente ou do endosperma, com etanol 80%, metanol:água (4:1) ou benzeno:etanol (2:1) sob refluxo, com a finalidade de inativar enzimas hidrolíticas presentes e simultaneamente extrair monossacarídeos, oligossacarídeos e pigmentos. Tais “contaminantes” podem também ser eliminados através da remoção manual prévia do tecido de proteção (tegumento) ou do embrião (cotilédones), eliminando-se assim uma considerável quantidade de proteínas e lipídios.

Um polímero, mesmo na ausência de qualquer aditivo, é uma mistura de macromoléculas de diferente massa molar. Portanto, num sentido restrito, não faz sentido

falar em massa molar de um polímero e sim numa distribuição de massa molar das macromoléculas que o constitui. No caso de polímeros, é importante conhecer um valor médio representativo da massa molar e a dispersão em torno desta média (o índice de polidispersidade). Do ponto de vista teórico, dois valores médios podem ser extraídos de uma distribuição de massa molar: massa molar numérica média (M_n) e massa molar ponderal média (M_w):

onde N_i representa o número de macromoléculas que tem a mesma massa molar M_i .

O índice de polidispersidade de um polímero (IP) é definido como a razão entre a massa molar ponderada por massa (M_w) e a massa molar ponderada pelo número (M_n).

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \qquad M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

Polímeros que possuem massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) muito próximos possuem um alto grau de homogeneidade e quanto maior for a sua diferença, tanto maior será a polidispersidade da amostra.

A estrutura geral das galactomananas permite três tipos de dispersão molecular, ou seja: (a) massa molecular, (b) proporção D-Man/D-Gal, e (c) distribuição da cadeia lateral. Alguns critérios de homogeneidade dos polissacarídeos isolados devem ser observados, nas etapas finais de purificação, como proporção M/G constante, eluição de um único pico na cromatografia por exclusão, e ultracentrifugação. Deve ser ressaltado, que os polissacarídeos são produtos de uma síntese não dirigida por um molde e, portanto, apresentam uma certa heterogeneidade na massa molecular e na proporção entre os monômeros. Segundo Tanford (1961) um polissacarídeo possui um “alto grau de homogeneidade” quando apresenta uma massa molecular média (M_w) e uma massa molecular numérica média (M_n) iguais. Entretanto, nenhum polissacarídeo tem apresentado homogeneidade com relação a massa molecular e, se a relação M_w/M_n aumenta, então a polidispersidade também aumenta. Para as galactomananas, além da polidispersidade, existe uma ampla faixa de moléculas que diferem também na proporção M/G. Também a constância na proporção de manose e galactose em todos os estágios de isolamento é um dos critérios usados para se avaliar a homogeneidade das galactomananas.

As estruturas primária das galactomananas tem sido determinada, por métodos convencionais da química de carboidratos, como: análises de metilação, oxidação com periodato, hidrólise enzimática específica e técnicas físico-químicas (ressonância magnética nuclear, difração de raios-X e espectroscopia-infravermelho). Cromatografia gás-liquída

(glc), espectrometria de massa acoplada a cromatografia gás-líquida e cromatografia líquida de alta pressão também são bastantes usados na determinação da razão entre os monômeros (M/G).

(c) -Estrutura macromolecular

O estudo da estrutura fina das galactomananas tem sido realizado a partir da caracterização das estruturas de oligossacarídeos, obtidos por hidrólises parciais enzimática e ácidas do polímero (SRIVASTAVA & KAPOOR, 2005).

Em sementes de *Adenantha pavonina*, a galactomanana apresenta uma estrutura convencional formada por uma cadeia linear constituída por unidades monossacarídicas de manose com ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e ramificações com unidades de D-galactose ligadas à cadeia principal de manose por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow6)$, distribuídas na cadeia principal de manose na proporção molar de manose:galactose de 1,8:1 (TAVARES, 1998).

Em sementes de *Schizolobium parahybum* (guapuruvu) (ZAWADZKI-BAGGIO *et al.*, 1992), e *Schizolobium amazonicum* (Leguminosae-Caesalpinoideae) (GANTER *et al.*, 1995), as galactomananas isoladas apresentaram uma proporção idêntica entre os monômeros (M/G 3:1) e uma mesma distribuição de unidades galactose ao longo da cadeia de manana. Embora a galactomanana obtida de sementes de *Cassia fastuosa* (Leguminosae-Caesalpinoideae) tenha apresentado a mesma relação M/G, sua estrutura fina difere significativamente das duas espécies *Schizolobium*, como mostrado por análises dos oligossacarídeos (DP 2-6) obtida por hidrólise ácida parcial (PETKOWICZ *et al.*, 1998).

Várias galactomananas apresentando a mesma estrutura convencional, têm sido isoladas de sementes não-leguminósicas, onde as galactomananas diferem apenas na relação entre os monômeros e sua distribuição das unidades de galactosil ao longo da cadeia.

Na família Mimosaceae, as galactomananas obtidas de *M. taimbensis* (M/G 1,16:1), *M. aspericarpa* (M/G 1,12:1), *Stryphnodendron barbatiman* (M/G 1,5:1) (REICHER *et al.*, 1992), *M. scabrella* (M/G 1,10:1), *M. bimucronata* (M/G 1,05:1) e *M. flocculosa* (M/G 1,09:1), apresentaram estrutura convencional de galactomananas de leguminosas (GANTER & REICHER, 1999; GANTER *et al.* 1995 & 1992).

Em endospermas de sementes de *Ipomoea campanulata* e *Ipomoea turpethum* (Convolvulaceae), as galactomananas obtidas, apresentaram estrutura similar a algumas gomas comerciais como guar e alfarroba (*Ceratonia siliqua* L) e uma relação M/G entre 1,5 e

2 respectivamente (SINGH *et al.*, 2003a & b). Também em sementes de *Phoenix dactylifera* (Palmae), a galactomanana apresentou uma estrutura clássica para as galactomananas e uma relação M/G em torno de 2,5 (ISHRUD *et al.*, 2001).

No entanto, algumas galactomananas apresentam desvios dessa estrutura padrão, como em certas espécies do gênero *Cassia* ou *Crotalaria*, que apresentam na cadeia principal, além da ligação β -(1→4), ligações do tipo β -(1→2) e pontos de ramificação contendo duas ou três unidades de galactose ligadas à cadeia principal por ligações α -(1→2) ou α -(1→6) (UNRAU & CHOY, 1970). Galactomanana isolada de sementes de *Melilotus indica* apresentou uma estrutura altamente ramificada, com a cadeia principal apresentando 36% de ligações 1→4 e 10% de ligações 1→2 (GUPTA & BOSE, 1986). Essa estrutura proposta para a galactomanana de *Melilotus indica* difere da estrutura clássica da galactomanana não apenas na cadeia de manana, mas também no modo de ligação das cadeias laterais. A ocorrência simultânea de unidades β -D-manopiranosil apresentando ligações (1→4) e (1→2) na cadeia de manana é rara, mas tem sido também documentada para as galactomananas de *Crotalaria mucronata* e *Caesalpinia pulcherrima* (UNRAU & CHOY, 1970). A presença, não muito freqüente, de cadeias curtas de unidades α -D-galactopiranosil ligadas (1→4) conectados a cadeia de manana por ligações (1→6), foi detectada em *M. indica* e em *Gleditsia triacanthos* (LESCHZINER & CERESO, 1970).

A distribuição das unidades D-galactose (G) ao longo da cadeia de D-manose (M), numa galactomanana, pode ocorrer de três formas (Figura 4) (DEA & MORRISON, 1975): a estrutura **A** representa um arranjo regular de cadeias laterais, **B** uma distribuição ao acaso e **C** uma estrutura na qual as cadeias laterais ocorrem em blocos. Vale ressaltar que podem ocorrer variações desses modelos entre as diversas galactomananas estudadas.

As propriedades físico-químicas e conformacionais das galactomananas estão estritamente relacionadas com a relação M/G e a distribuição de galactose ao longo da cadeia principal. A galactomanana de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) com razão M/G próxima de 4 apresenta baixa solubilidade à temperatura ambiente quando comparada com a goma de Guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L.), cuja relação M/G é cerca de 1,6:1 (McCLEARY *et al.*, 1985).

Devido a polidispersidade apresentada pelas galactomananas, muitas delas podem apresentar uma massa molar numérica média e uma massa molar ponderal média com significativa diferença (DEA & MORRISON, 1975).

As galactomananas isoladas de alfarroba (*Ceratonia siliqua*), guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L.) e fenogrego (*Trigonella foenum-graecum*) apresentaram massa molecular

(M_w) de $1,2 \times 10^6$ kDa, $1,3 \times 10^6$ kDa e $1,4 \times 10^6$ kDa, respectivamente. Entretanto, os valores para viscosidade intrínseca e raio de giro (R_g) obtidos, foram 14,38 dl/g para alfarroba (R_g 82,88 nm), 10,5 dl/g para guar (R_g 76,64 nm) e 9,61 dl/g para fenogrego (R_g 75,08 nm). Portanto, embora a goma de fenogrego tenha a maior massa molecular, esta apresenta o menor valor de viscosidade intrínseca (BRUMMER *et al.*, 2003). Considerando que as três gomas apresentam valores próximos de M_w , é lógico esperar que a goma de alfarroba (M/G=4:1) tenha uma viscosidade intrínseca significativamente maior comparada à da goma de guar (M/G=2:1) e da goma de fenogrego (M/G=1,1;1). Um outro fator que contribui para a alta viscosidade intrínseca apresentada pela goma de alfarroba é a ocorrência de ligações (agregações) intermoleculares, entre cadeias do polímero, mesmo em soluções diluídas (RICHARDSON *et al.*, 1998).

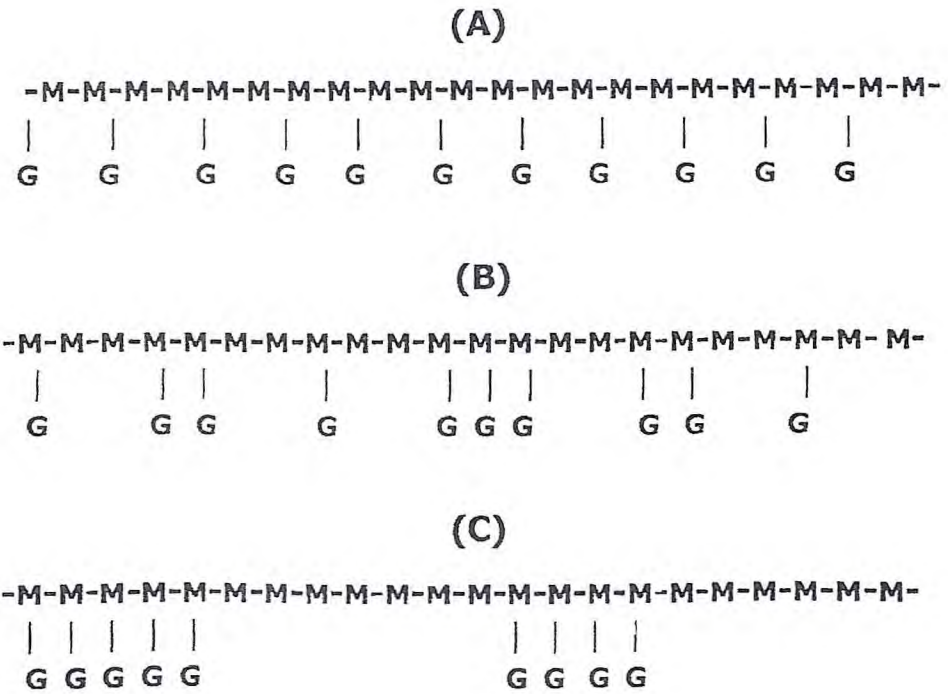


FIGURA 4 -Possíveis arranjos das unidades de galactose (G) na cadeia de manose (M) de uma galactomanana com proporção M/G de 2:1 (DEA & MORRISON, 1975).

Esses resultados sugerem que a agregação molecular diminua com o grau de substituição da cadeia de manana por unidades galactosil. O alto grau de substituição por unidades galactosil da goma de fenogrego, implica em uma menor tendência em formar interações intermoleculares. A goma de guar possui uma viscosidade intrínseca um pouco maior que a de fenogrego, embora apresentando um M_w menor. De forma análoga, esses resultados podem ser interpretados para as interações intermoleculares em alfarroba, embora esses efeitos sejam menos frequentes para goma de guar, em virtude de seu alto grau de substituição por galactose. Portanto, o baixo valor de viscosidade intrínseca para a goma de fenogrego comparada com as gomas de guar e de alfarroba, a despeito das massas moleculares, sugere que um M_w maior é consequência da alta substituição da cadeia de manana (BRUMMER, *et al.*, 2003).

Têm sido mostrado experimentalmente e por modelamento molecular que a introdução de unidades galactosil na cadeia de manana induz uma diminuição na dimensão da cadeia, reduzindo assim a viscosidade intrínseca (PETKOWICZ *et al.*, 1999 & 1998).

O teor de galactose nos polissacarídeos produz ainda um efeito pronunciado em suas propriedades reológicas. O interesse pelas galactomananas surgiu de sua habilidade em formar soluções aquosas altamente viscosas. Suas propriedades reológicas foram incentivadas e mais estudadas a partir das gomas comercialmente importantes (alfarroba e guar). Em solução aquosa, galactomananas adquirem a conformação espiral ao acaso, uma condição que pode ser revertida para uma forma mais ordenada, onde condições para agregação ou interação com outras espécies possam ocorrer. Na cadeia β -(1 \rightarrow 4)-manana e em β -(1 \rightarrow 4)-glucana, cujas unidades são ligadas através de duas hidroxilas equatoriais, obrigatoriamente adotam uma conformação rígida e as cadeias se apresentam em forma de fita, tanto em solução quanto no estado sólido (WINTER & HUBER, 2000).

Tem sido mostrado que as cadeias laterais de galactose têm pouco efeito na conformação da cadeia de manana no estado sólido. Entretanto, essas unidades desempenham um papel importante na solubilidade das galactomananas (DEA & MORRISON, 1975).

(d)- Funções da galactomanana

As galactomananas apresentam duas funções biológicas importantes: retenção de água (durante a embebição da semente) e fornecimento de energia (durante a germinação). Embora a capacidade de reter água seja a mais importante, esses carboidratos são colocados no grupo dos polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC).

Possuidoras de uma alta capacidade de retenção de água (60% do peso da semente), não apenas protegem as sementes contra desidratação, como também criam um ambiente propício para o desenvolvimento do embrião, embebendo a semente e permitindo que a germinação ocorra. Certos autores sugerem que as galactomananas apresentam uma terceira função, a de defesa (DAOUD, 1932).

(e) Biossíntese das galactomananas

O metabolismo das galactomananas em plantas, seus principais estágios e vias gerais foram esclarecidos no início de 1980 (DEY, 1980).

As galactomananas são sintetizadas nas células endospermicas, à partir de açúcares nucleosídeos-difosfato (Figura 5). A conversão de frutose-6-fosfato a glucose-1-fosfato e manose-1-fosfato resulta na produção de dois nucleotídeos-glucose: GDP-glucose e UDP-glucose. Esses compostos são transformados pelas enzimas 2'-epimerase e 4'-epimerase em GDP-manose e UDP-galactose, respectivamente. Posteriormente, esses açúcares nucleotídeos doam suas unidades glucosil e manosil para a construção do polissacarídeo, o qual possui uma cadeia principal e ramificações de galactose. Esse processo é mediado por duas glicosiltransferases incorporadas na membrana celular: *manosiltransferase*, que requer a presença de íons Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} , e a enzima *galactosiltransferase*, dependente de íons magnésio. Para o início do processo de síntese da galactomanana é requerido um aceptor galactosil endógeno (*primer*), cuja natureza ainda é pouco entendida (SCHERBUKHIN & ANULOV, 1999).

Durante o desenvolvimento da semente, as galactomananas são depositadas na parede celular das células endospermicas (REID & MEIR, 1973). Em *Trigonella foenum-graecum*, a galactomanana depositada preenche todos os espaços ocupados pelo protoplasto, o qual degenera (MEIR & REID, 1977). Ao final do processo de deposição, o endosperma da semente de fenogrego forma uma massa de tecido não-vivo, cheio de galactomanana, limitado por uma única camada de células vivas – a camada de aleurona (REID, 1971). Durante a

germinação, essas células produzem enzimas hidrolíticas para a mobilização das galactomananas (REID *et al.*, 1977). Em sementes de guar, a camada de aleurona é formada por várias camadas de células (McCLENDON *et al.*, 1976), enquanto que em alfarroba (*Ceratonia siliqua*) não existe camada de aleurona especializada, todas as células endospermicas retém um protoplasto vivo (SEILER, 1977).

Utilizando enzimas na forma particulada isolada de endospermas de sementes de guar e fenogrego em desenvolvimento e na presença de GDP-manose, UDP-galactose e das enzimas manosiltransferase e galactosiltransferase foi possível obter a síntese do polímero *in vitro* (EDWARDS *et al.*, 1989). Os produtos formados *in vitro* apresentaram uma alta insolubilidade em água e quando hidrolisados e submetidos a ação das enzimas β -D-mananase e α -D-galactosidase, liberaram por hidrólise D-galactose, manobiose, D-manose e manotriose, com predominância dos dois primeiros, sendo a relação M/G proporcional ao grau de substituição do polissacarídeo.

A hidrólise da cadeia de manana pela β -D-mananase sozinha, também fornece informações sobre o grau de substituição da galactomanana. A hidrólise da galactomanana é fortemente influenciada pelas ramificações por unidades de galactose na cadeia de manana, uma vez que a enzima apresenta uma alta atividade sobre as regiões não-substituídas, preferindo as regiões de ligações β -(1 \rightarrow 4) onde a população de galactose é menor (McCLEARY & MATHESON, 1983). Assim sendo, as galactomananas de alfarroba, guar e fenogrego com graus de substituições diferentes (32%, 61% e 97% respectivamente), apresentaram um percentual de hidrólise de 25% para alfarroba, de 1% para guar e menos que 1% para fenogrego (EDWARDS *et al.*, 1989).

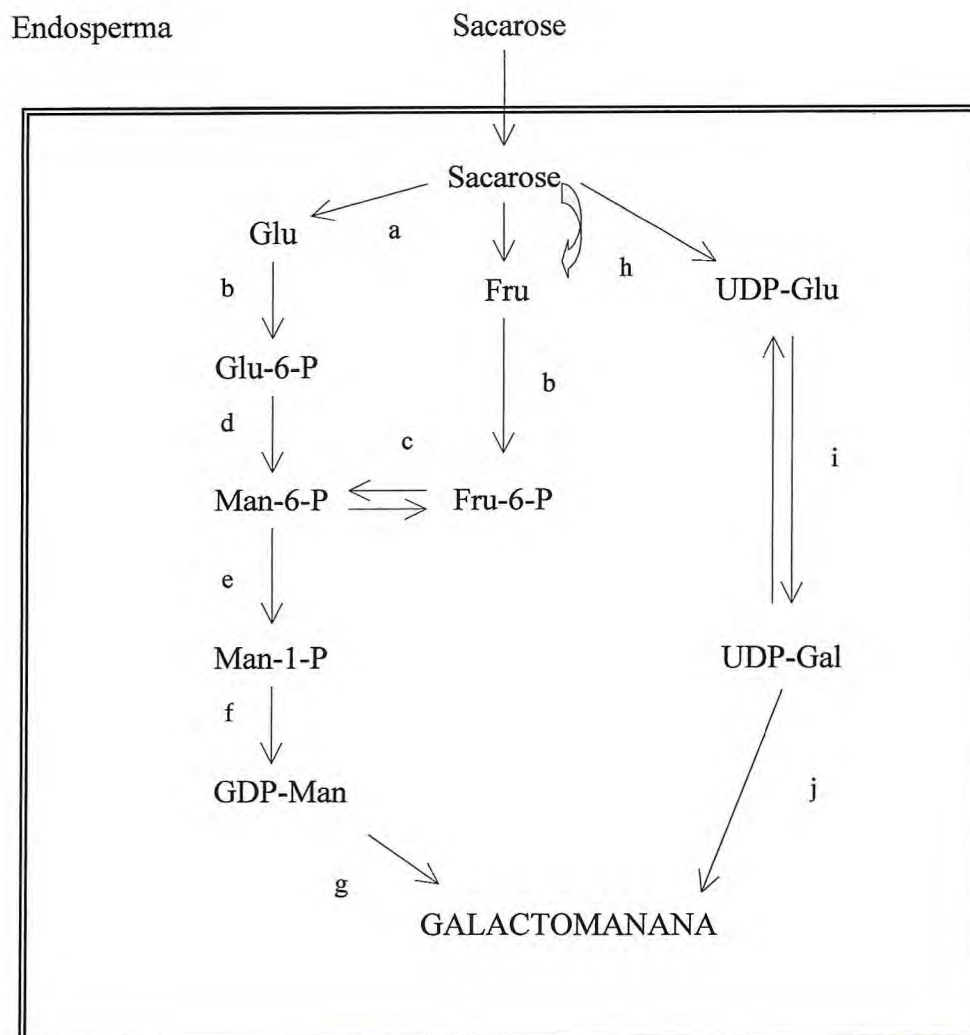


FIGURA 5-Via de síntese da galactomanana em endosperma de sementes de leguminosas em desenvolvimento. Enzimas: a: invertase; b: hexoquinase; c: hexose-fosfato-isomerase; d: fosfomanoisomerase; e: fosfomanomutase; f: GTP-Man-1-P guanossiltransferase; g: GDP-Man-manossiltransferases; h: sacarose-sintase; i: epimerase; j: UDP-Gal-galactossiltransferase (BEWLEY & BLACK, 1994).

O controle da relação M/G durante a biossíntese da galactomanana *in vitro* foi alcançado através da manipulação das concentrações do substrato GDP-manose, na mistura de incubação, com o sistema enzimático isolado de sementes de fenogrego e de guar. As membranas biossintéticas contêm uma β -D-(1 \rightarrow 4)-manosiltransferase ligada a GDP-manose e uma α -D-galactosiltransferase ligada a UDP-galactose, que interagem cooperativamente catalisando a formação de uma galactomanana. Na ausência de UDP-galactose, a manosiltransferase sintetiza uma β -D-(1 \rightarrow 4)-manana não substituída. Níveis saturantes de açúcares-nucleotídeos, cofatores juntamente com o sistema de membrana de fenogrego e de guar, catalisaram a formação de uma galactomanana de baixo conteúdo de galactose, diferente das galactomananas de alto e médio conteúdo de galactose, característico das sua espécies. Galactomananas com grau de substituição próximo dos valores *in vivo* foram obtidos através da redução nos níveis de GDP-manose na mistura de incubação e, manutenção de níveis saturantes de UDP-galactose. Nessas condições foi observado uma diminuição das enzimas manosiltransferase e galactosiltransferase, com uma diminuição relativamente maior para a manosiltransferase. Como consequência é sintetizada uma galactomanana com um grau de substituição similar à encontrada *in vivo*. Foi concluído então, que existe uma correlação entre os níveis de substrato e as glicosiltransferases durante a deposição da galactomanana *in vitro* (EDWARDS *et al.*, 1989) e que, possivelmente a galactosilação da cadeia de manana seja regulada a nível de genoma (provavelmente no estágio dos açúcares precursores de nucleotídeos) e da cooperação fina entre as duas transferases, que é em parte atribuída à sua orientação espacial na membrana (REID, *et al.*, 1992).

No sistema enzimático ligado à membrana que catalisa a biossíntese da galactomanana, a α -D-galactosiltransferase não pode atuar independentemente. Ao mesmo tempo em que a manosiltransferase catalisa a elongação da cadeia de manana, no lado terminal não-redutor, a α -D-galactosiltransferase transfere galactose a uma unidade de manose no final da cadeia ou próximo a este. A transferência de unidades de galactose à cadeia de manana em crescimento não acontece ao acaso. Usando mano-oligossacarídeos com 5 até 8 (M5 a M8) unidades manosil, foi demonstrado que uma unidade de galactose é transferida por molécula aceptora e que a ligação formada é do tipo α -(1 \rightarrow 6), como nas galactomananas. A ligação da α -D-galactosiltransferase à molécula aceptora requer uma sequência de reconhecimento compreendendo seis unidades de manose, com a transferência

da galactose ocorrendo na terceira unidade de manose, a partir do terminal não-redutor da sequência (EDWARDS *et al.*, 2002).

As atividades das enzimas galactosiltransferase e manosiltransferase em extratos de endospermas de sementes de *Trigonella foenum-grecum*, *Cyamopsis tetragonoloba* e *Senna occidentalis* em desenvolvimento, acompanharam a deposição da galactomanana. No entanto, algumas espécies apresentaram uma variação nas atividades relativas das enzimas manosil- e galactosiltransferase. Em fenogrego e guar, a relação manosil/galactosiltransferase foram similares, com poucas variações durante a deposição da galactomanana, mas em *Senna occidentalis* essa relação apresentou um aumento crescente, à medida que a deposição procede (EDWARDS *et al.*, 1992).

O controle da proporção M/G *in vivo* deve ser exercido ao nível do sistema biossintético, através das atividades das enzimas manosiltransferase e galactosiltransferase, da regulação do reservatório celular dos açúcares-nucleotídeo, e na especificidade da galactosiltransferase, que determina o padrão de substituição da cadeia de manana. Por outro lado, esse controle pode ser exercido por um processo de modificação pós-deposição, ou seja, uma remoção controlada, pela ação da enzima α -galactosidase, que remove unidades galactosil de uma galactomanana altamente substituída (EDWARDS *et al.*, 1992).

Vários trabalhos têm mostrado uma exata correspondência entre as variações na proporção M/G e a atividade da enzima α -galactosidase nos extratos de endosperma de sementes em desenvolvimento. Durante a deposição da galactomanana de *S. occidentalis*, foi observado um aumento pronunciado na atividade da α -galactosidase, aos 49 dias após o florescimento (DAF) e, uma variação na proporção M/G de 2,3, nos estágios iniciais, para 3,3 ao final do processo de deposição, o que sugere a ocorrência de uma modificação pós-deposição. Por outro lado, em fenogrego e guar, os níveis da α -galactosidase foram constantes, com uma diminuição moderada durante a deposição da galactomanana, não sendo encontradas evidências de uma modificação pós-deposição (EDWARDS *et al.*, 1992). Galactomananas obtidas de sementes de *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae-Caesalpinioideae) em diferentes estágios de maturação, apresentaram um aumento na relação M/G de 2,1, no início da deposição para 2,9 ao final do processo (MALLETT *et al.*, 1987). Para explicar tal resultado, os autores postularam uma mudança na conformação do complexo formador da galactomanana, rejeitando a ação da α -galactosidase, baseado no fato de que a atividade dessa enzima encontra-se baixa na semente madura. Também foram encontradas variações na proporção M/G de galactomananas isoladas durante o desenvolvimento de

Coffea arabica. Nas primeiras semanas após o florescimento, o polissacarídeo apresentou uma alta substituição, com uma proporção manose/galactose entre 2:1 e 7:1 e, ao final do processo, a galactomanana menos substituída, apresentou uma proporção M/G entre 7:1 e 40:1. Os resultados indicaram que o grau de substituição da galactomanana de sementes de café é regulado durante o desenvolvimento e pode resultar, em parte, de uma modificação do produto sintético primário pela ação de uma α -galactosidase (REDGWELL *et al.*, 2003).

1.5.3- Características gerais da biossíntese de polissacarídeos de parede celular

Os polissacarídeos da parede celular são formados basicamente por nove diferentes monossacarídeos principais (glucose, galactose, manose, xilose, arabinose, fucose, ramnose, ácido galacturônico e ácido glucurônico) e outros em menores quantidades (CARPITA & GIBEAUT, 1993). Uma vez que esses polissacarídeos apresentam múltiplas ligações, é óbvio que a síntese de cada ligação específica requer uma enzima diferente. Dessa forma, muitas enzimas diferentes são requeridas para a síntese de polissacarídeos de parede celular. Por exemplo, na biossíntese da pectina são requeridas 46 diferentes glicosiltransferases (MOHNEN, 1999).

Duas categorias de enzimas estão envolvidas na biossíntese de polissacarídeos: - *sintase de glucana* e *glicosiltransferases*. As *sintases de glucana* são enzimas que formam as ligações entre os açúcares da cadeia principal de qualquer polissacarídeo. Pouco se sabe sobre a localização dessas enzimas no aparelho de Golgi (AP) e nenhum dos genes que codificam para essas enzimas foram identificados até o momento (PERRIN *et al.*, 2001).

As *glicosiltransferases* catalisam a transferência de uma unidade de açúcar, a partir de um doador, açúcar-nucleotídeo, para uma molécula aceptora. Elas geralmente apresentam um alto grau de especificidade com respeito aos doadores de açúcares, as moléculas que servem como aceptoras, e a ligação formada. As *glicosiltransferases* são normalmente proteínas integrais de membrana do tipo II, contendo um pequeno domínio amino-terminal no lado citoplasmático, e um domínio carboxi-terminal hidrofílico, contendo o sítio ativo no lúmen do aparelho de Golgi (BRETTON & IMBERTY, 1999; KEGSTRA & RAIKHEL, 2001; SCHEIBLE *et al.*, 2004). Essas enzimas têm sido amplamente estudadas em animais, fungos, e bactérias (BRETTON & IMBERTY, 1999), mas as glicosiltransferases biossintéticas de parede celular de plantas, apenas recentemente foram purificadas e os genes que as codificam identificados (PERRIN *et al.*, 1999).

A biossíntese de polissacarídeos é bastante diferente da síntese de outros biopolímeros, como as proteínas e ácidos nucleicos, que são sintetizados à partir de um molde que determina a sequência de monômeros dentro do polímero. Ao contrário, a sequência dos açúcares em um polissacarídeo é determinada pela especificidade das enzimas que formam as ligações entre os monossacarídeos.

O processo de síntese de um biopolímero pode ser dividido em três estágios: iniciação, alongação e terminação. Na biossíntese de um polissacarídeo, observa-se que a etapa de iniciação requer um iniciador (*primer*), que pode ser uma proteína, como no caso do glicogênio (SMYTHE & COHEN, 1991). Entretanto, até o momento não se sabe ao certo, se a iniciação de um polissacarídeo de parede celular requer um *primer*. A etapa de alongação é determinada pela especificidade da enzima. Alguns polissacarídeos são construídos sem substituições na cadeia lateral, como é o caso da enzima *sintase de glucana*, que forma ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) (GIBEAUT & CARPITA, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 1999). Por outro lado, a *sintase de glucana* envolvida na biossíntese da xiloglucana, só é capaz de formar o esqueleto de β -(1 \rightarrow 4)-glucana se a *xilosiltransferase*, que adiciona xilose a cadeia lateral, estiver presente (HAYASHI, 1989; WHITE, 1993).

Algumas especulações existem sobre o mecanismo de terminação da cadeia. É possível que a terminação da cadeia ocorra quando o polissacarídeo é transportado para a parede celular via tráfego de vesículas, dessa forma separando-o das enzimas de síntese, ou mecanismos específicos determinam quando a cadeia está terminada, resultando na remoção das enzimas biossintéticas responsáveis pela alongação (PERRIN *et al.*, 2001).

1.6-Lectinas

As lectinas são (glico) proteínas de origem não imune que aglutinam células e/ou precipitam carboidratos complexos (GOLDSTEIN, 1980). Essa habilidade de reconhecer e de ligar-se reversivelmente a carboidratos específicos, sem induzir qualquer modificação química nos mesmos, é o que distingue as lectinas de outras proteínas e enzimas ligantes de carboidratos. Como consequência deste reconhecimento, as lectinas interagem com células induzindo uma série de modificações fisiológicas. Entre as principais características das lectinas, destacam-se a capacidade de aglutinar hemácias, induzir a proliferação linfocitária e reconhecer células cancerosas.

Essa definição clássica de lectinas tem recebido algumas alterações em virtude das características estruturais observadas no crescente número de lectinas isoladas e sequenciadas. Dessa forma, Peumans e Van Damme (1995) descrevem as lectinas como proteínas de origem não imune possuindo pelo menos um domínio não catalítico de ligação a carboidratos, capaz de ligar-se a mono- ou oligossacarídeos específicos. Com base na sua estrutura, as lectinas podem ser agrupadas em cinco tipos: **merolectinas**, que apresentam apenas um único sítio ligante a carboidratos; **hololectinas**, que possuem dois sítios e **quimerolectinas**, que além do domínio ligante a carboidratos, apresenta um sítio com atividade catalítica (PEUMANS E VAN DAMME, 1995); **superlectinas**, proteínas de fusão, com dois domínios de ligação a carboidratos, estruturalmente diferentes e reconhecendo carboidratos distintos (VAN DAMME, 1998) e as **multilectinas**, lectinas que possuem apenas um tipo de sítio de ligação mas reconhecem carboidratos diferentes (MONTEIRO-MOREIRA, 2000).

Além das diferenças estruturais apresentadas pelas lectinas, estas apresentam uma reatividade específica para cada monossacarídeo, que diferem na configuração do C₃ e C₄ do anel piranosídico. Dessa forma, as lectinas podem ser agrupadas de acordo com sua especificidade por açúcares simples, em lectinas ligantes de: L-fucose, D-galactose/N-acetil-D-galactosamina, D-glucose/D-manose, N-acetil-glucosamina, e ácido siálico (MÄKELA, 1957; PUSZTAI, 1991; MOREIRA, *et al.*, 1991).

As lectinas tem sido isoladas de um grande número de organismos, desde plantas e animais até microorganismos e vírus (SHARON & LIS, 1989). No entanto, é nos vegetais onde encontram-se a maior parte das lectinas estudadas, destacando-se as plantas superiores, fontes muito ricas dessas proteínas.

A maioria das lectinas já estudadas foi isolada de sementes de Dicotiledôneas, sendo encontradas principalmente nas sementes da família das leguminosas, representando 10% do

total de proteínas deste órgão (CHRISPELLS & BOLLINI, 1982). No entanto, a distribuição das lectinas difere entre as várias famílias. Nas leguminosas, embora pequenas quantidades de lectinas possam estar presentes nos eixos, e mesmo nas cascas das sementes, a maior parte se encontra nos cotilédones, em organelas conhecidas como corpos proteícos (SHARON & LIS, 1989). As lectinas de leguminosas compartilham muitas características estruturais, tais como sequência de aminoácidos, estrutura secundária e conformação tridimensional de suas unidades estruturais (SHARON & LIS, 1990), o que sugere que esta família de proteínas evoluiu à partir de um ancestral comum.

Na classe das Monocotiledôneas, a maior parte das lectinas isoladas são da família Gramineae, onde as mesmas apresentam uma similaridade estrutural, são ricas em glicina e cisteína e possuem especificidades semelhantes. Entre as lectinas isoladas de espécies pertencentes a esta família podemos citar a de trigo (*Triticum vulgare*) (MARCHESI, 1972) e de arroz (*Oriza sativa*) (SHEN *et al.*, 1984).

A maioria das lectinas de leguminosas isoladas são constituídas de uma unidade estrutural de 25 a 30 kDa que associa-se em duas ou quatro unidades, podendo ser idênticas ou não, cada uma possuindo um único sítio de ligação a carboidrato, com a mesma especificidade (SHARON & LIS, 1989). A associação entre as subunidades pode variar com o pH em que elas se encontram. A maioria das lectinas requer a presença de íons metálicos divalentes para poder exercer suas atividades biológicas. Estes íons interagem em sítios específicos na estrutura proteica, conferindo um alto grau de estabilidade estrutural, protegendo-as contra inativação pelo calor, hidrólise por enzimas proteolíticas, além de ajudarem a formar o sítio de ligação e fixar a posição de alguns resíduos de aminoácidos que interagem com o açúcar ligante (LIS & SHARON, 1981).

A determinação da especificidade por carboidratos das lectinas é comumente realizada através de um ensaio de inibição por haptenos.

As lectinas parecem estar envolvidas no transporte de açúcares ou reservas de proteínas, na proteção da planta contra patógenos e insetos, participando do fenômeno de reconhecimento tanto intercelular quanto intracelular (PUSZTAI, 1991; SHARON & LIS, 1989). Com lectinas vegetais, é observado, ainda, o seu envolvimento na simbiose das bactérias do gênero *Rhizobium* com as leguminosas. As bactérias podem se fixar na planta, através da interação direta entre carboidratos presentes na superfície dos pêlos radiculares e lectinas nas raízes, e esta interação mostra alto grau de especificidade. Outra hipótese relacionada à função das lectinas, envolvendo o processo de reconhecimento celular,

compreende a interação pólen-pistilo (KNOX *et al.*, 1976). As lectinas parecem exercer, ainda, uma função de reserva nas plantas, funcionando como reservas de nitrogênio, ou como proteção contra possíveis predadores (PEUMANS & Van DAMME, 1995). A função de defesa das plantas contra o ataque de fungos e insetos, tem sido atribuída, principalmente às lectinas que ligam quitina, um polissacarídeo de N-acetil-glicosamina, que constitui um elemento estrutural importante da parede celular de muitos fungos patogênicos, do exoesqueleto, e do trato digestivo dos insetos e da cutícula de nematóides (PEUMANS & Van DAMME, 1994; LERNER e RAIKHEL, 1992). Além disso, muitas dessas lectinas possuem uma alta toxicidade *in vitro* a vários insetos e fungos (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

Algumas lectinas apresentam, ainda, toxicidade para células animais. É comum as sementes, em sua forma natural, manifestarem acentuados efeitos tóxicos. Cerca de 30% dos alimentos de origem vegetal *in natura*, e mesmo alimentos industrialmente processados, contém lectinas ativas. Todos os animais estão sujeitos ao contato direto com as referidas substâncias (VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004).

Carboidratos presentes nas superfícies das células, tanto na forma de glicoproteínas e glicolipídeos (eucariótica) ou polissacarídeos (procarióticas), servem como sítio de ligação para as lectinas. Devido a essa interação, as lectinas estão associadas a diferentes atividades biológicas podendo assim, serem utilizadas em um grande número de aplicações (Tabela 4).

A propriedade mais conhecida das lectinas é sua capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies, sendo esta uma das maneiras mais fáceis para revelar a presença de lectina em um material biológico. Essa técnica que utiliza hemáceas humanas ou ainda eritrócitos de outros animais, geralmente 2%, consiste em se realizar diluições seriadas do extrato proteico, e após incubação a 27 °C, a presença de lectinas no material testado fica evidenciada caso as células se mostrem aglutinadas e se tal aglutinação for reversível pela adição de carboidratos simples ou complexos a mistura. Além de eritrócitos, outras células tais como leucócitos e células tumorais, também podem ser aglutinadas por lectinas (BEUTH, 1995). Muitas destas proteínas têm sido utilizadas em vários estudos imunológicos, e em alguns casos, estimulam células do sistema imune.

A aglutinação é o resultado da interação dos açúcares presentes na superfície da célula com os sítios de ligação a carboidratos das lectinas. Essas interações envolvem pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (MIRELMAN, 1986). As lectinas presentes na superfície celular mediam as interações célula-célula por ligação com carboidratos complementares localizados na superfície de células opostas, podendo estas células serem iguais ou diferentes. As lectinas participam da interação célula-célula de

TABELA 4- Alguns usos de lectinas como ferramentas biotecnológicas

-
1. Isolamento, purificação e estudos estruturais de polímeros contendo carboidratos.
 2. Investigação de estruturas de carboidratos complexos na superfície de células e de partículas subcelulares de animais, bactérias e vírus.
 3. Investigação da arquitetura de superfícies celulares e suas mudanças sob transformação maligna.
 4. Tipagem sanguínea, estudos estruturais de substâncias de grupo sanguíneo, identificação de novos grupos sanguíneos, diagnóstico de secretores.
 5. Isolamento de subpopulações de linfócitos.
 6. Estudos de genética, biossíntese e função de glicoconjugados de superfícies celulares.
 7. Estimulação mitogênica de linfócitos, estudos de eventos após a iniciação da divisão celular, estudo de constituição cromossomial de células e detecção de anormalidades cromossomiais.
 8. Estudos de sítios de ligação específica carboidratos/proteínas.
 9. Estudos de estimulação linfocitária (produção de linfocinas) e na citotoxicidade celular dependente de lectinas.
 10. Tipagem de parasitas.
 11. Como agentes terapêuticos no tratamento do câncer, doenças autoimunes e infecciosas, sob a forma de toxinas recombinantes (imunotoxina).
 12. Agentes defensivos de pragas na Agricultura.
-

diversas maneiras: (1) lectinas presentes na superfície da célula ligam-se a glicoproteínas solúveis formando pontes interligando as duas células; (2) lectinas combinam-se com carboidratos de componentes insolúveis da matriz extracelular, promovendo a adesão entre as células; (3) lectinas solúveis podem se ligar a carboidratos em células opostas, atuando como uma ponte para essas células.

A estimulação mitogênica de linfócitos por certas lectinas, constitui uma de suas principais atividades biológicas, uma vez que a estimulação de linfócitos é um fenômeno chave na resposta imunológica. A primeira lectina mitogênica a ser descoberta foi a de *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960). Posteriormente, a capacidade de ativar linfócitos foi conferida a outras lectinas e atualmente a concanavalina A (ConA), purificada de sementes de *Canavalia ensiformis*, o mitógeno “pokeweed” (*pokeweed mitogen*, PWM), isolada de *Phytolacca americana*, e a WGA, extraída do germe de trigo, são amplamente utilizadas em diversos ensaios imunológicos, induzindo diferentes efeitos biológicos sobre populações de linfócitos (PEACOCK *et al.*, 1990).

Várias lectinas da sub-tribo *Diocleinae* foram testadas quanto a indução de mitose em linfócitos humanos e proliferação de interferon- λ . Os resultados mostram não somente que essas proteínas são fortemente ativas nestes dois aspectos, mas mostram também respostas peculiares, com diferentes intensidades (BARRAL-NETO *et al.*, 1992).

A fim de estabelecer as propriedades moleculares, fisiológicas e possível aplicabilidade das lectinas é necessário primeiro que se tenha essas proteínas na forma pura. Até recentemente, as lectinas eram isoladas através de métodos tradicionais de fracionamento de proteínas (MOREIRA & PERRONE, 1977), como: extração, precipitação com soluções salinas, filtração em gel, interação hidrofóbica e troca iônica. No entanto, devido ao fato das lectinas serem capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a carboidratos, um novo método de isolamento tem sido empregado, a cromatografia de afinidade. Neste processo, ocorre a interação da lectina com uma matriz derivada ou ligada, a um açúcar inibidor específico desta proteína e, posteriormente, sua eluição com uma solução do açúcar específico ou por diminuição do pH do eluente (LIS *et al.*, 1974). O prévio conhecimento do açúcar pelo qual a lectina é específica, permite a escolha de um suporte cromatográfico adequado. A preparação obtida por afinidade é geralmente homogênea quando examinada por uma variedade de critérios e não requer purificações posteriores (SHARON & LIS, 1989).

O uso da cromatografia de afinidade para o isolamento de lectinas surgiu com o trabalho de AGRAWAL & GOLDSTEIN (1965), que isolaram a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA), em coluna de Sephadex G-50. Hoje, praticamente todo processo de isolamento de lectinas depende deste tipo de cromatografia e, diversas matrizes de afinidade para isolamento de lectinas já foram desenvolvidas e estão disponíveis comercialmente. Nesse tipo de cromatografia é usada uma coluna recheada com um suporte insolúvel ao qual é ligado covalentemente o açúcar inibidor. Em alguns casos a matriz já contém em sua estrutura o açúcar específico, como é o caso da Sephadex. Numa etapa posterior, a lectina retida na coluna é eluída com a solução do açúcar inibidor, ou por redução do pH do eluente. São ainda usadas como matrizes, quitina, goma de guar e hemácias glutarizadas.

Várias matrizes contendo açúcares ligados covalentemente, bem como aquelas cujas estruturas apresentam açúcares reativos imobilizados, podem ser utilizados como suportes para cromatografias de afinidade, tais como: Sephadex (MOREIRA *et al.*, 1983; MOREIRA & CAVADA, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1997) Sepharose 4B (MACHUKA *et al.*, 1999), Sepharose-N-acetilgalactosamina, goma de guar (PADMA, *et al.*, 1999; CAVADA *et al.*, 1998; PADMA, 1999), quitina (WHITMORE, 1992), estroma de hemácias (ZENTENO *et al.*, 2000; MOREIRA & OLIVEIRA, 1983), e fetuína-Sepharose (PINTO, 1987; MO *et al.*, 1999). No entanto, estas além de serem muito caras, contém como grupo ligante monossacarídeos que não conseguem distinguir lectinas com diferentes especificidades finas. Assim, é da maior importância, a identificação de polissacarídeos naturais, com diferentes estruturas, que sejam capazes de distinguir estas lectinas.

Além das matrizes encontradas comercialmente, atualmente muitos polissacarídeos naturais, insolúveis, são adsorventes sensíveis para o isolamento de lectinas, entre os quais se destacam as gomas de sementes de leguminosas (APPUKUTTAN *et al.*, 1997; MOREIRA *et al.*, 1997; TAVARES, 1998). Atualmente, a utilização de gomas naturais tem sido bastante utilizada, após o tratamento para formação de ligações cruzadas com epícloridrina (MOREIRA *et al.*, 1997). Eles são geralmente baratos e nem sequer precisam ser quimicamente homogêneos, embora precisem estar completamente livres de substâncias que possam ser liberadas por lixiviação, durante a cromatografia. Diversas sementes tiveram suas gomas endospermicas investigadas, e todas mostraram ser basicamente constituídas por uma galactomanana ramificada, com diferentes proporções de manose/galactose e contendo diferentes monossacarídeos, em proporções e posições diversas, o que possibilita a obtenção

de colunas de afinidade com capacidade de interação diferente com lectinas que, mesmo apresentando a mesma especificidade, mostram afinidades diferentes quando interagem com as mesmas (especificidade refinada).

As lectinas de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia*, específicas por D-galactose, isoladas inicialmente por troca iônica em coluna de DEAE-celulose (MOREIRA & AINOZ, 1981) e por afinidade em colunas de estroma de hemácias humana (MOREIRA & OLIVEIRA, 1983) estão sendo, agora com mais eficiência, isoladas por afinidade em colunas de galactomananas de *Adenanthera pavonina*, reticuladas com epiclorigrina (MOREIRA *et al.*, 1998). No entanto, as lectinas de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia*, mesmo apresentando uma elevada semelhança estrutural, físico-química e imunológica, interagem de maneira diferente com a goma de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e goma de carolina (*Adenanthera pavonina*).

Certas plantas, por outro lado, exsudam do caule gomas mais complexas contendo, usualmente, galactose, ramnose, arabinose e ácido glucurônico. Usando a goma arábica, extraída de *Acacia senegal* como matriz, Fujita *et al.* (1975), desenvolveram uma coluna de afinidade capaz de ligar lectinas galactose específicas.

Uma das linhas de pesquisa desenvolvida no *Lab. de Lectinas e Glicoconjugados* é a identificação destes polissacarídeos e subsequente reticulação dos mesmos de modo a obter matrizes mais específicas. Neste aspecto, alguns resultados extremamente animadores já foram obtidos. Matrizes de afinidade já foram construídas com galactomananas endospermicas de *Adenanthera pavonina* (TAVARES, 1998), *Delonix regia*, *Parkinsonia aculeata*, *Schizolobium parahybae* e *Caesalpinia pulcherrima* (BRAGA, 2001). Estas galactomananas são formadas por uma cadeia linear de unidades D-manose unidas por ligação β (1 \rightarrow 4), com substituições de galactose em α (1 \rightarrow 6), e diferentes proporções manose/galactose. Estas matrizes, além de se mostrarem capazes de isolar eficientemente lectinas D-galactose específicas apresentaram diferenças na afinidade de diversas lectinas vegetais específicas por D-galactose possivelmente devido às suas diferenças estruturais. Assim é que a lectina de *Abrus precatorius*, se liga muito fracamente a estas galactomananas enquanto as lectinas de *Artocarpus incisa* e de *Artocarpus integrifolia*, por outro lado, se ligam fortemente.

1.7 – A espécie *Caesalpinia pulcherrima*

Família

Leguminosae-Caesalpinioideae

Sin: *Poinciana elata* Lour, *Poinciana bijuga* Lour, *Poinciana pulcherrima* L.

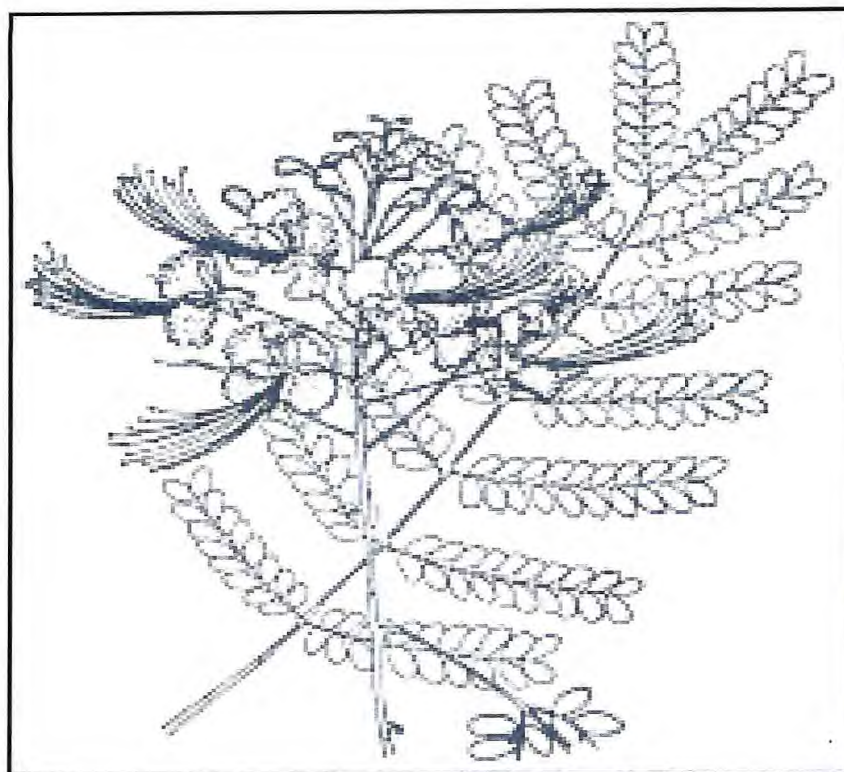
Nomes populares

Flamboianzinho, flor-de-pavão, orgulho-de-barbados, chagueira, flor-do-paráiso, barba-de-barata, brio-de-estudante, flamboyant-de-jardim

Características gerais

Arbusto lenhoso, semi decíduo, espinhento, de 3-4m de altura, originária das Antilhas, tronco fino, ereto, casca parda-acinzentada e superfície irregular. Ramagem com espinhos esparsos, formando pequena copa arredondada. Folhas grandes, compostas, alternas, bipinadas, com 6-10 pares de pinas opostas, cada pina com igual nº de pares de folículos opostos elítico ovalados. Inflorescências terminais, em panículas alongadas, com flores de pétalas e estames longos vermelhos, formados no decorrer do ano todo, discentes, achatadas, com sementes ovaladas, verde-escuras, planas. Ocorre a variedade flava de flores amarelas bem como a de flores-vermelho-encarnadas (magenta). Multiplica-se exclusivamente por sementes, as quais são abundantemente produzidas em nossas condições.

Planta muito florífera e ornamental, é amplamente utilizada no paisagismo em geral, cultivada como arbusto florífero e como árvore, principalmente na forma isolada em parques e jardins. Na forma de renque é utilizada para formação de cercas vivas defensivas. É também muito cultivada na arborização de ruas estreitas sob redes elétricas pelo pequeno porte que apresenta (LORENZI *et al.*, 2003).



Flores de Caesalpinia pulcherrima

2-OBJETIVO GERAL

Isolamento, purificação, caracterização estrutural, estudo da biossíntese da goma endospermica de *Caesalpineia pulcherrima* e avaliação da possibilidade de aplicação da goma, obtida nos diferentes estágios de maturação da semente, visando a obtenção de matrizes para purificação de lectinas por cromatografia de afinidade.

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

1. Acompanhar o desenvolvimento da semente de *Caesalpinia pulcherrima*, através de curvas de massa fresca e massa seca;
2. Determinar por análises químicas a evolução dos principais constituintes;
3. Acompanhar por análise morfológica a deposição dos compostos de reserva;
4. Isolar e caracterizar as galactomananas do endosperma em diferentes estágios de desenvolvimento;
5. Acompanhar a síntese da galactomanana através da determinação de sua massa molar, viscosidade e da relação entre seus monossacarídeos constituintes;
6. Obter matrizes cromatográficas a partir da reticulação da galactomanana obtida do endosperma da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento;
7. Avaliar a capacidade das matrizes cromatográficas em reter lectinas galactose-ligantes, através de cromatografias de afinidade com extratos totais de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia*.

4.0-MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Plantio

Sementes de *Caesalpinia pulcherrima* foram colocadas para germinar em sacos apropriados e após 30 dias foram transferidas para o campo experimental. Após 6 meses surgiram as primeiras flores e deu-se início a marcação das mesmas.

4.2- Colheita das vagens

As flores de *Caesalpinia pulcherrima* foram datadas no dia de sua abertura ou florescimento (antese), considerado-se este o dia zero. As vagens foram coletadas inicialmente a intervalos de 2 dias, abertas e suas sementes pesadas e feitas medidas morfológicas. As coletas continuaram até a completa maturação da semente, o que ocorreu por volta do 49º- 51º dias após o florescimento (DAF).

4.3- Caracterização da semente e evolução de seu crescimento durante o processo de maturação

As características morfológicas das sementes de *Caesalpinia pulcherrima* (comprimento, largura e espessura) foram obtidas pela média dos valores para uma amostra de 50 sementes nos diferentes dias de maturação. Utilizou-se um paquímetro digital para a obtenção das medidas.

4.4- Determinação da massa fresca e massa seca

As sementes de *Caesalpinia pulcherrima* coletadas, foram imediatamente pesadas, abertas e separadas em seus tecidos constituintes. Todo esse material foi utilizado para as determinações de umidade e cinzas, e posteriormente para a obtenção da curva de massa fresca e massa seca durante o desenvolvimento da semente.

4.5- Análise química

4.5.1- Determinação de umidade

Para a determinação de umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo amostras de tegumento, endosperma e cotilédones de *Caesalpinia pulcherrima*, foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas. Em seguida, foram deixados em um dessecador, sobre sílica, até atingir o equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo então pesados, e assim sucessivamente, até que os pesos permanecessem constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre as massas inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em percentagem.

4.5.2- Determinação de cinzas

Amostras de tegumento, cotilédones e endosperma (1g) foram colocadas em cadinhos previamente incinerados, levados à mufla até a temperatura de 600 °C, por 4 horas, até incineração completa da matéria orgânica, sendo posteriormente mantidos em um dessecador sobre sílica, até atingir a temperatura ambiente. A seguir, os cadinhos foram pesados e o teor de cinzas calculado pela relação entre a massa do resíduo e a massa inicial da amostra e expresso em percentagem.

4.5.3- Determinação de nitrogênio total

O nitrogênio total foi dosado pelo método semi-micro Kjeldahl (Hiller *et al.*, 1948) em farinha de cotilédones e de endospermas em diferentes dias de maturação. Para mineralização foram utilizadas amostras de 100 mg, as quais foram adicionadas 6ml de ácido sulfúrico concentrado e 1,0 g da mistura catalítica (sulfato de potássio e sulfato de cobre, 9:1). Após mineralização, as amostras foram diluídas com água bidestilada para um volume de 100 ml. Para a destilação foram usadas alíquotas de 10 ml desta solução, às quais foram adicionados 10 ml de NaOH 40%. A amônia liberada foi coletada em 20 ml de ácido bórico 4% e titulada com HCl 0,01N.

O teor de nitrogênio (%) foi calculado conforme a fórmula abaixo:

$$N (\%) = \frac{(V_a - V_b) \times N_{\text{HCl}} \times 0,014 \times 100 \times F}{M_a}$$

Onde: V_a = volume de HCl usado p/titular a amostra

V_b – volume de HCl usado p/titular o branco

N = normalidade do HCl

M_a = massa da amostra/10 ml

F = fator de conversão de padronização do HCl

0,014 = equivalente grama do nitrogênio

O teor de proteína total (%) foi calculado multiplicando-se o valor de nitrogênio total por 6,25 para os cotilédones e 5,25 para os endospermas.

4.5.4- Determinação de lipídios totais

O teor de lipídios totais foi determinado essencialmente conforme descrito por Triebold (1946) em farinha de endosperma em diferentes estágios de maturação, substituindo-se éter por hexana. Amostras contendo 1,5 g foram pesadas em cartuchos de papel de filtro e colocadas em um extrator Soxhlet com hexana. A extração foi efetuada por 4 horas, depois que o solvente foi evaporado em banho-maria a 70 °C, pesando-se posteriormente o extrato hexânico. O teor de lipídios foi calculado como a relação entre a massa do resíduo do balão de extração (lipídios extraídos) e a massa seca da amostra, sendo o valor expresso em percentagem.

4.6- Obtenção do endosperma bruto de sementes de *Caesalpinia pulcherrima*

Parte dos endospermas obtidos das sementes coletadas ao longo do processo de maturação (sementes imaturas) foram separados manualmente, colocados em acetona e secos a vácuo, sendo posteriormente submetido a moagem e peneirado (*endosperma não-tratado*). A outra parte foi submetida a um tratamento térmico prévio para inativação enzimática usando metanol:água (4:1 v/v) sob ebulição durante 20 minutos. Após esse tratamento os mesmos foram colocados em acetona e posteriormente secos a vácuo, moídos e acondicionados em frascos (*endosperma-tratado*).

4.7- Determinação da proteína solúvel do endosperma da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento.

A concentração de proteínas nos extratos totais do endosperma foram determinadas pelo método de FOLIN-LOWRY (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando-se como padrão albumina bovina (100 µg/ml) e efetuando-se leituras a 750 nm.

4.8-Obtenção dos polissacarídeos do endosperma tratado de *Caesalpinia pulcherrima*

O endosperma bruto (4g) das sementes em diferentes dias de maturação foram submetidos a extrações com H₂O (800 ml) por 12 horas, sob agitação. Após centrifugação (3.000g x 20min.), os extratos foram precipitados com etanol 1:4 (v/v) e deixados em contato por 12 horas. Após esse tempo, os polissacarídeos precipitados (galactomananas) eram novamente solubilizados em água destilada e deixados em contato sob agitação por mais 12 horas. Mais dois ciclos de precipitação e redissolução foram realizados, sendo o carboidrato precipitado na última etapa, colocado em acetona e posteriormente seco à vácuo, para obtenção da galactomanana 1 (GM₁). A seguir o resíduo da 1^a extração foi submetido a extrações sequenciais com H₂O a temperatura de 60 °C, colocado na estufa por 2 horas e posteriormente por 12 horas para obtenção das galactomananas 3 e 4. O resíduo 4 foi submetido a extrações com NaOH 2M e 4M, na presença de boroidreto de sódio, por 2 horas a temperatura ambiente. Após centrifugação, os extratos foram precipitados com etanol 1:4 (v/v), lavados 3 vezes com acetona e secos a vácuo para obtenção das hemiceluloses e mananas (Figura 6).

4.9- Caracterização físico-química das diferentes frações polissacarídicas

4.9.1-Estimativa da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Galactomananas (GM₁) extraídas de endospermas em diferentes estágios de maturação foram submetidas a cromatografia de permeação em gel (GPC) para a determinação da massa molar. Galactomananas foram solubilizadas em solução de NaNO₃ 0,1 M (4 mg/ml) e após 12 horas sob agitação a 40 °C foram filtradas em membrana de nylon com poros de 0,2 µm. As soluções preparadas foram injetadas (50 µl), com fluxo de 0,5 ml/min. em uma coluna Ultrahydrogel Linear de 7,8 x 300 mm (Waters), sendo utilizada, como fase móvel, solução

de NaNO_3 0,1 M a temperatura ambiente. A curva de calibração foi construída utilizando-se de padrões de pululana (Shodex Denko) com massas molares em intervalo de grandeza de 10^3 a 10^6 g/mol. As detecções das frações dos polissacarídeos e da presença de proteínas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo LC-10AD (Shimadzu), com detectores de índice de refração (RID-8^A) e ultravioleta (UV-VIS SPD-10AV).

4.9.2- Viscosidade

Foram determinadas as viscosidades intrínsecas das soluções de galactomananas obtidas do endosperma em diferentes dias de maturação.

Os tempos de escoamento das soluções foram determinados em viscosímetro capilar de Ostwald ref. 75, em banho termostático Marca Quimis, à temperatura controlada de 26 °C.

As soluções de galactomananas (2 mg/ml) em diferentes dias de maturação foram obtidas por dispersão em água a temperatura ambiente, sob agitação por 12 horas. Diluições posteriores foram realizadas para obtenção de uma ampla faixa de concentrações.

As viscosidades relativas, específicas e reduzidas foram calculadas utilizando-se amostras em concentrações variáveis de 0,1 a 1,0 mg/ml. A variação da viscosidade reduzida extrapolada para a concentração zero forneceu a viscosidade intrínseca ($[\eta]$).

A viscosidade relativa (η_{rel}) corresponde à relação entre a viscosidade da solução (η) e a viscosidade do solvente (η_0), onde o tempo de fluxo da solução (t) e do solvente foram cronometrados.

As determinações das viscosidades específicas das soluções foram feitas de acordo com a equação:

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \qquad \eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}$$

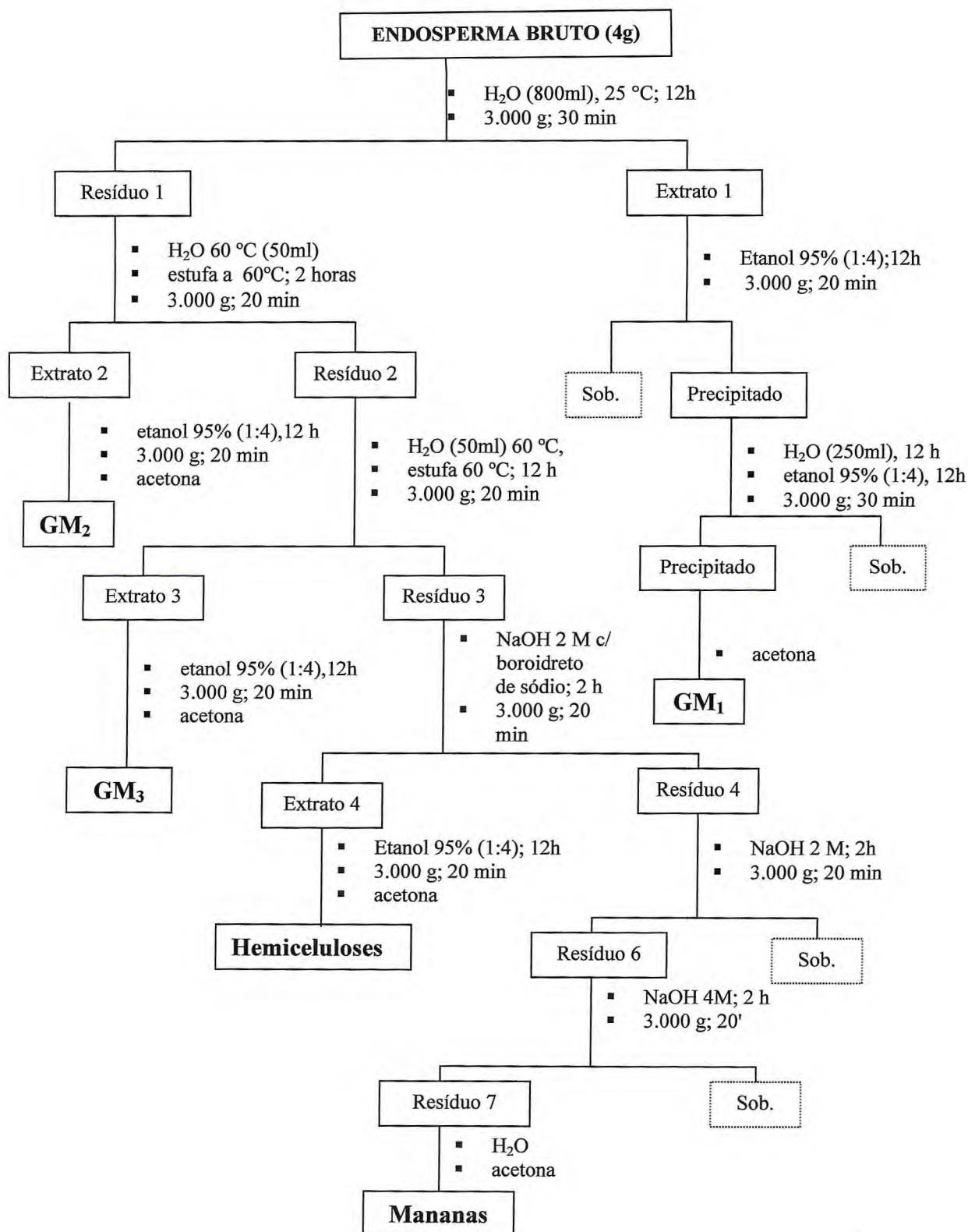


FIGURA 7- Fluxograma de extração dos polissacarídeos endospermícos da semente de *Caesalpinia pulcherrima*.

As viscosidade reduzidas (η_{red}), que correspondem à relação entre a viscosidade específica e a concentração da solução, foram determinadas para as soluções acima mencionadas, a diversas concentrações, conforme a equação:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C}$$

As viscosidade intrínsecas ($[\eta]$) foram determinadas para as galactomananas medindo-se a viscosidade das soluções em baixas concentrações, em gráficos, na intercessão do eixo os valores de η_{red} contra a concentração do polissacarídeo (dl/g), e então extrapolando a uma diluição infinita, onde $c \rightarrow 0$. O valor da viscosidade para a concentração zero é denominado de viscosidade intrínseca, segundo a equação:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}$$

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ pode ser determinada pela equação de Huggins :

$$\eta_{esp}/C = [\eta] + K_H[\eta]^2C$$

4.9.3- Hidrólises ácidas

As hidrólises ácidas totais das galactomananas obtidas nos diferentes dias de maturação foram feitas em tubos devidamente lacrados, com ácido trifluoroacético (TFA). Galactomananas (10 mg) foram solubilizadas em 1ml de H₂O destilada e deixadas sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente. A seguir foi adicionado 1 ml de TFA 4 M deixado sob agitação por alguns minutos e posteriormente colocados em estufa a 100 °C por 2 ½ horas. Ao término da hidrólise, as amostras foram colocadas separadamente em placas de Petri por 12 horas a temperatura ambiente, para a remoção por evaporação do excesso do ácido.

4.9.4- Determinação de açúcares por cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em placas de sílica gel Merk (20 x 20 cm) ativada em estufa a 100°C por 30 minutos. Após a hidrólise, o resíduo

final após evaporação total, foi solubilizado em água (0,5 ml) e com o uso de capilares, as soluções obtidas e os padrões de açúcares (20 mg/ml), foram aplicados. Primeiramente, a placa foi desenvolvida em *n*-butanol:etanol:água (4:1:1), seca ao ar e novamente desenvolvida em *n*-butanol:ácido acético:água na proporção 4:1:1 (v/v/v) (MULLIMANI & PRASHANTH, 2002) e colocada novamente para secar ao ar. A revelação foi feita com borrifação de uma solução ácida de orcinol (0,2% de orcinol em solução aquosa de H₂SO₄ 40%), seguida de aquecimento em estufa a 100 °C, por 20 min. A partir das manchas reveladas foram calculados os R_fs (fator de retenção) dos padrões e das amostras.

4.9.5- Redução e acetilação dos produtos das hidrólises ácidas

Para a cromatografia gás-líquida (g.l.c.) foi feita hidrólise de Saeman (H₂SO₄, 72 %; 1h; banho de gelo; diluição do ácido para 5%; 6 h; 100 °C).

Os monossacarídeos resultantes das galactomananas hidrolisadas foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH₄) por 18 horas a temperatura ambiente e, em seguida foi efetuada a remoção do íon Na⁺ pela adição de resina LEWATIT S-100 (forma H⁺). Após filtração, as soluções foram concentradas, em evaporador rotatório a vácuo, com temperatura de no máximo 50 °C, até secura. Lavagens sucessivas com 2 ml de metanol (3 vezes) eram feitas a fim de eliminar o ácido bórico formado por codestilação com o metanol, na forma de éster volátil de borato de trimetila.

Os alditóis resultantes foram então acetilados a temperatura ambiente, com uma mistura de anidrido acético:piridina 1:1 (v/v), por 16 h. O processo de esterificação foi interrompido pela adição de gelo moído e os produtos acetilados extraídos com 2 ml de clorofórmio. A piridina residual na fase clorofórmica foi removida com sucessivas lavagens com solução de CuSO₄ 5% e água destilada. Os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por g.l.c.

4.9.6- Cromatografia líquido-gasosa (GLC)

As cromatografias líquido-gasosas (GLC) foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 5890 series II, com detector de ionização de chama, utilizando-se como gás de arraste Nitrogênio e coluna 3% de DB-210 sob “gas chrom Q” de 100-200 mesh, em tubo de aço inoxidável 30 m x 0,25 mm (d.i.) com detector a 250 °C, injetor a 250 °C e fluxo de nitrogênio a 40,0 ml/ min. A temperatura da coluna para os produtos de hidrólise na forma de acetato de alditol era de 250 °C.

4.9.7- Espectro no Infravermelho

Amostras liofilizadas das galactomananas foram misturadas com brometo de potássio e então pressionadas para obtenção de uma partícula. Foi usado um espectrofotômetro modelo Perkin-Elmer 1320 trabalhando em um comprimento de onda entre 4000 e 400 nm.

4.10- Modificação química da goma de *Caesalpinia pulcherrima* obtida em diferentes dias de maturação

Diferentes matrizes cromatográficas foram montadas à partir da goma de *Caesalpinia pulcherrima* isolada em diferentes estágios do desenvolvimento da semente. As matrizes foram preparadas segundo APUKUTTAN (1977), com algumas modificações nas quantidades de goma e de epícloridrina usadas. Para cada 0,5 g da goma foram adicionados 0,15 ml de epícloridrina 12,38 M e 1,5 ml de NaOH 3 M a 40 °C. A mistura foi agitada manualmente até solidificar, mantida em estufa por 24 horas a 40 °C e por 12 horas a 70 °C. Após este período, o material foi lavado exaustivamente com água destilada, para eliminar todo NaOH e epícloridrina em excesso presente no meio. O material foi homogeneizado e passado em peneira de 30 mesh, tendo as partículas finas sido retiradas por lavagem exaustiva com água destilada, congeladas e liofilizadas.

4.1.1- Montagem das colunas cromatográficas

Dos géis liofilizados foram retirados 0,4 g e colocados para intumescer em água destilada. As colunas foram montadas deixando-se o gel sedimentar por gravidade, lavadas exaustivamente com NaCl 0,15 M e tampão glicina 0,1 M pH 2,6 em NaCl 0,15 M e depois equilibrada novamente com NaCl 0,15 M para retirada de todo material solúvel, ainda presente. Com este procedimento foi obtido colunas com um volume total de 5 ml.

4.1.2- Cromatografia de afinidade

Os experimentos de cromatografia de afinidade foram realizados utilizando-se amostras ricas em lectinas específicas por D-galactose. Foram utilizados extratos totais (1:10 p/v) em NaCl 0,15 M de *Artocarpus integrifolia* e de *Artocarpus incisa*. Após a aplicação de 2 ml de extrato total, a eluição do material não retido foi feita com a mesma solução de equilíbrio, seguida de tampão glicina 0,1 M pH 2,6 c/NaCl 0,15 M. A eluição foi realizada a um fluxo constante de 20 ml/hora e as frações de 2 ml/tubo tiveram suas absorbâncias determinadas a 280 nm.

4.1.3- Ensaio de atividade hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante do extrato total e dos picos eluídos das cromatografias foram realizados pelo método descrito por MOREIRA & PERRONE (1977), em placas de microtitulação de fundo V. As amostras foram submetidas a diluições duplo seriadas (1:2, 1:4, 1:8,...), em NaCl 0,15 M e foi adicionado a estas diluições, igual volume de uma suspensão de hemácias a 2%, sem tratamento enzimático. As placas foram colocadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 30 minutos, seguidos por mais 30 minutos à temperatura ambiente. A presença de coágulos foi determinada a olho nu. A atividade hemaglutinante (UH) foi considerada como sendo o inverso da última diluição que ainda apresentou aglutinação visível.

4.14- Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações protéicas obtidas por cromatografia de afinidade nas diferentes colunas de goma de *Caesalpinia pulcherrima* foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida,

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol foram feitos segundo a técnica de LAEMMLI (1970), usando-se um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e um gel de separação contendo 12,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5, pH 8,8. As placas utilizadas tinham dimensões de 14 cm de largura por 12 cm de altura. A espessura do gel foi de 1 mm. A corrida foi desenvolvida a uma temperatura de 7 °C, com a amperagem inicial fixada em 25 mA e voltagem inicial de 70 Volts. A voltagem foi ajustada para que não excedesse a 150 Volts, evitando assim o aquecimento do sistema. As corridas tiveram duração média de 40 minutos.

As amostras (100 μ l) foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 8,3 contendo SDS 1%, β -mercaptoetanol, sacarose e azul de bromofenol (50 μ l). As amostras foram previamente aquecidas em água (12 min) e centrifugadas por 1 minuto em centrífuga Eppendorf.

Após a corrida, as bandas foram visualizadas por revelação com prata segundo procedimento descrito por Blun *et al.* (1987).

4.15- Determinação da atividade α -galactosidásica

A determinação da atividade α -galactosidásica em extrato de endosperma não tratado foi realizada de acordo com o método de Dey & Pridham (1969). A mistura de reação foi composta de 0,5mL de extrato e 0,5 ml do substrato sintético p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo dissolvido em tampão McIlwaine pH 5,0 (citrato de sódio 25 mM e fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 5,5 ou 4,0). Após 45 minutos a 45 °C, em banho-maria, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 ml de carbonato de sódio 0,1 M. A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de produto formado, medindo-se a absorbância em 400nm e subtraindo-se de cada leitura o valor da prova em branco. A diferença em absorbância foi transformada em unidades de atividade (UA), sendo uma UA correspondente a uma A_{450} de 0,01. Os valores de UA foram multiplicados pelos fatores de diluição e pelos volumes dos extratos. A atividade α -galactosidásica foi expressa em UA por endosperma e a

atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade total pela concentração de proteína ($UA \times mgP^{-1} \times h^{-1}$).

4.16- Microscopia de luz

4.16.1-Fixação

Sementes de *C. pulcherrima* em diferentes estágios de maturação foram fixadas em uma solução contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 durante 8 h à 4 °C (KARNOVSKY, 1965). Após a fixação as sementes foram desidratadas em série etanólica de concentração crescente, incluídas em Histo-resin (Embedding Kit - Jung) e em seguida cortadas (5 μ m) em micrótomo rotativo Leica RM 2065.

4.16.2-Colorações

(i)-Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT)

O azul de Toluidina é um corante usado para evidenciar grupos aniônicos totais.

A coloração pelo AT em tampão McIlvaine a pH 4 é realizada durante 15 min à temperatura ambiente, seguindo-se de três banhos rápidos em água destilada, secagem ao ar, diafanização em xilol durante 10 min e montagem em Entellan (VIDAL, 1977).

O AT é um corante que apresenta radicais NH_3^+ livres na sua molécula, podendo ser usado em soluções de pH 2,0 até pH 11-12. O pH da solução tampão exerce uma importância muito grande na solução corante. Os grupos carboxila dos carboidratos são corados a partir de pH 2,5; o DNA e o RNA coram-se a partir de pH 3,5 e finalmente, carboxilas de proteínas, acima de pH 4,0. O AT pH 4,0 cora as paredes celulares das células vegetais devido a presença das substâncias pécticas na estrutura das paredes (VIDAL, 1977).

(ii)-Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP)

O Xylidine Ponceau (XP) é um corante aniônico, que apresenta dois radicais sulfato. A pH 2,5, as proteínas podem ser visualizadas, pois neste pH seus grupos amino estão protonados e ligam-se eletrostaticamente ao XP, que por sua vez, apresentam seus radicais sulfato desprotonados (CORTELAZZO & VIDAL, 1991).

A solução de XP foi preparada a 0,1% em ácido acético 3%, pH 2,5. No presente trabalho a coloração foi feita durante 15 min à temperatura ambiente, seguindo-se lavagem em ácido acético 3% durante 30 min, água destilada (2 min), desidratação em etanol 95% e 100% (2 min cada), diafanização em xilol durante 10 min e montagem em Entellan (CORTELAZZO & VIDAL, 1991).

(iii)- Ácido Periódico de Schiff (PAS)

O método do ácido periódico de Schiff (PAS) é geralmente utilizado para evidenciar polissacarídeos neutros. Em vegetal, através do PAS, evidencia-se celulose, hemiceluloses e amido. Essa reação baseia-se na oxidação de grupos hidroxila de carbonos vicinais pelo ácido periódico (HIO_4), formando dois radicais aldeídicos. Em um segundo momento esses radicais se ligam ao reativo de Schiff, que é uma solução incolor, preparada a partir da fucsina básica. Esse corante apresenta cor magenta e, sob a ação do anidrido sulfuroso, tem o seu grupo cromofó rico alterado, originando uma solução sem cor. Essas moléculas incolores ligam-se aos grupos carbonila (formados pela oxidação das hidroxilas), restabelecendo assim, a região cromofórica (CORTELAZZO *et al.*, 1983; VIDAL, 1987).

Os cortes foram oxidados com ácido periódico 0,5% durante 9 min, lavados em água destilada e cobertos com reativo de Schiff durante 30 min, a temperatura ambiente e no escuro. A seguir, foram lavados em água sulfurosa (3 banhos de 3 min cada), desidratados em etanol 95% e 100%, diafanizados em xilol e montados em Entellan (CORTELAZZO *et al.*, 1983).

5.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Evolução do desenvolvimento da semente de *Caesalpinia pulcherrima*

A formação da semente constitui uma fase crítica no ciclo de vida das plantas superiores. O crescimento e o desenvolvimento da semente de *C. pulcherrima* foram acompanhados por medidas de massa da semente (massa fresca e massa seca) e de suas partes constituintes (tegumento, endosperma e cotilédones), além de medidas de tamanho da semente (comprimento, largura e espessura). A evolução do desenvolvimento da semente também foi acompanhado através de análise morfológica das sementes em diferentes estágios de maturação e através da análise química de seus principais constituintes químicos. Sob as condições usadas durante todo o processo, o completo desenvolvimento de sementes de *C. pulcherrima* ocorreu entre o 45° e o 49° DAF, quando as sementes atingiram a maturidade fisiológica (sementes quiescentes).

5.1.1- Crescimento da semente

O desenvolvimento da semente de *C. pulcherrima* foi acompanhado por medidas de tamanho das mesmas realizadas a partir do 21° dia após o florescimento (DAF) até a semente completamente madura, o que ocorreu entre o 45° e 49° dia após o florescimento. As sementes apresentaram um crescimento contínuo ao longo de seu desenvolvimento, apresentando uma diminuição em suas dimensões ao final do processo (Tabela 5, Figura 7 e 8). A semente quiescente ou madura apresenta as dimensões 0,827 cm x 0,664 cm x 0,294 cm (comprimento, largura e espessura) com 44% de endosperma, 37,5% de tegumento e 23,3% de cotilédones. Outros autores relataram que o endosperma da semente quiescente de *C. pulcherrima* apresenta um conteúdo de 38-40% (Caesalpinaceae) e para *Cassia javanica* (Caesalpinaceae) o endosperma corresponde a 52-54% da massa total da respectiva semente (ANDRADE *et al.*, 1999).



A



B

Figura 7- Vagens verdes (A) e quiescentes (B) de *Caesalpinia pulcherrima*.

TABELA 5- Medidas do crescimento (comprimento, largura e espessura) da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento. Os valores são a média de pelo menos cinquenta medidas independentes.

DAF	Comprimento (cm) ($\bar{x} \pm \sigma$)	Largura (cm) ($\bar{x} \pm \sigma$)	Espessura (cm) ($\bar{x} \pm \sigma$)
20	0,748 ± 0.021	0,398 ± 0.013	0,154 ± 0.011
23	0,844 ± 0.054	0,509 ± 0.045	0,182 ± 0.022
25	0,943 ± 0.044	0,606 ± 0.033	0,218 ± 0.027
29	1,112 ± 0.049	0,728 ± 0.019	0,314 ± 0.020
31	1,138 ± 0.007	0,719 ± 0.013	0,300 ± 0.000
33	1,161 ± 0.048	0,791 ± 0.051	0,351 ± 0.051
35	1,155 ± 0.007	0,791 ± 0.001	0,335 ± 0.007
37	1,197 ± 0.033	0,835 ± 0.043	0,411 ± 0.038
39	1,161 ± 0.016	0,819 ± 0.041	0,397 ± 0.066
41	1,220 ± 0.022	0,833 ± 0.020	0,430 ± 0.018
43	1,182 ± 0.023	0,831 ± 0.017	0,408 ± 0.029
45	1,213 ± 0.028	0,830 ± 0.061	0,431 ± 0.021
47	1,231 ± 0.069	0,889 ± 0.023	0,416 ± 0.039
49	1,123 ± 0.045	0,789 ± 0.016	0,315 ± 0.115
Q	0,827 ± 0,040	0,664 ± 0,034	0,294 ± 0,032

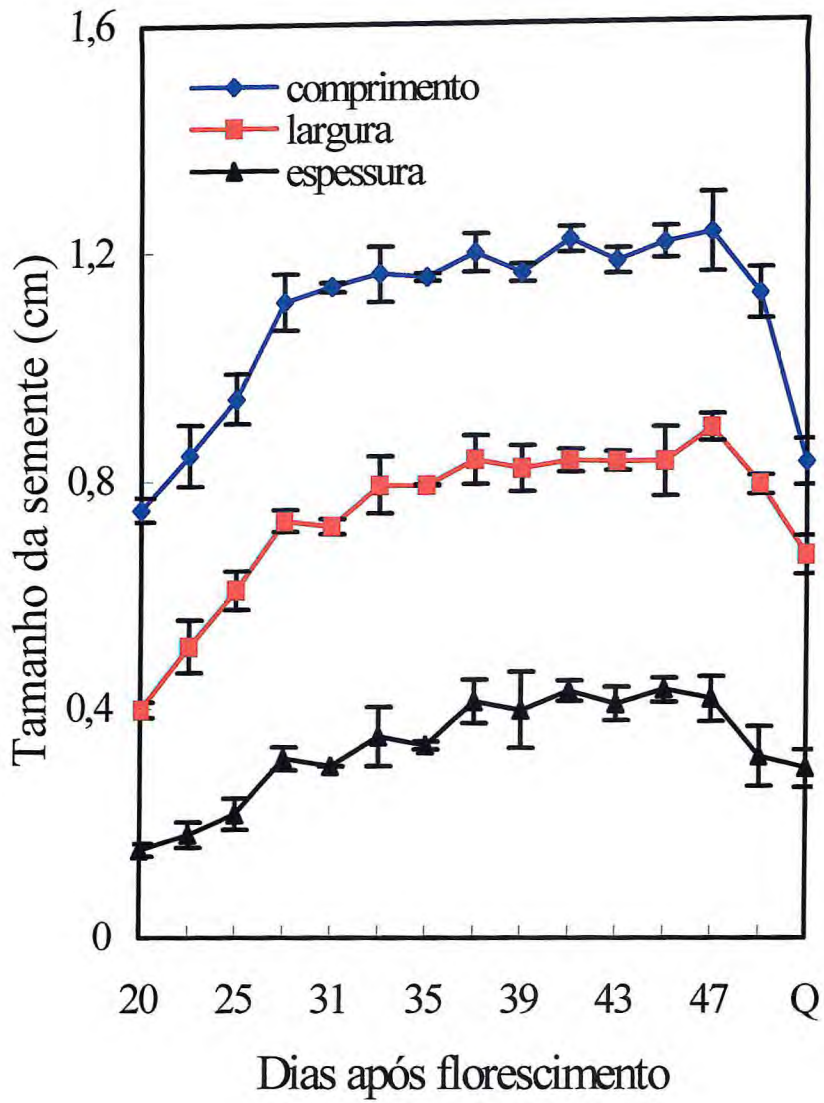


FIGURA 8- Evolução do desenvolvimento da semente de *Caesalpinia pulcherrima* através de medidas de crescimento (comprimento, largura e espessura).

5.1.2- Determinação da massa fresca e massa seca

Durante o desenvolvimento da semente de *C. pulcherrima* observa-se que entre o 25° e 37° dias após o florescimento (DAF), a massa fresca das sementes aumenta drasticamente. Entre o 37° e o 47° DAF a massa fresca permanece constante, diminuindo aos 51 dias para um valor de 0,307 g/órgão ao final do processo. Com relação ao acúmulo de massa seca observa-se um aumento contínuo até o 49° DAF (0,161 g/órgão) com uma discreta diminuição no 51° DAF (0,149 g/órgão) (Tabela 6 e Figura 9).

Pode-se observar um aumento drástico na curva de massa fresca para o tegumento até o 37° DAF (0,098 g/órgão). A seguir, observa-se uma estabilização da massa fresca até o 49° DAF (0,105g/órgão), para a seguir decrescer ao final do processo para um valor de 0,090 g/órgão no 51° DAF. A curva de massa seca segue um padrão sigmóide com um rápido aumento entre o 25° e 47° DAF e um decréscimo nos últimos dias de maturação (49°-51° DAF). O conteúdo de água decresce quase que linearmente até o final do processo (Tabela 7 e Figura 10).

A curva de massa fresca para o endosperma obtida durante o desenvolvimento da semente de *C. pulcherrima* apresentou um aumento drástico entre o 25° e 39° DAF, atingindo um valor de 0,098 g/órgão. A seguir observa-se um aumento gradual até atingir um valor máximo de 0,106 g/órgão (47° DAF), seguido por um suave decréscimo no 51° DAF (0,090 g/órgão). Quando as curvas de massa fresca e massa seca são comparadas, nota-se que à partir do 39° até o 45° DAF, ocorre uma estabilização no ganho de massa fresca e massa seca, o que pode ser comprovado pela diminuição gradual no teor de água nesse período. No entanto, na curva de massa seca observa-se um aumento contínuo até o 49° DAF (0,057 g/órgão) com uma discreta diminuição no 51° DAF (Tabela 8 e Figura 11).

A curva da variação de massa fresca de cotilédones ao longo da maturação (Tabela 9 e Figura 12) nos mostra que ocorre um aumento brusco até o 39° DAF, alcançando uma massa de 0,089 g/órgão, seguido de um aumento gradual para um valor máximo de 0,095 g/órgão (45° DAF). Ao final do processo (51° DAF) esse valor cai para 0,079 g/órgão. A curva de peso seco obtida para os cotilédones apresentou um aumento contínuo até o 45° dia, com um valor máximo de 0,057 g/órgão, e um decréscimo ao final do processo para um valor de 0,036 g/órgão (51° DAF).

TABELA 6 – Massa fresca (g/órgão) e massa seca (g/órgão) da semente de *Caesalpineia pulcherrima* em desenvolvimento. Os valores são a média de pelo menos vinte sementes.

DAF	Massa fresca ($\bar{x} \pm \sigma$)	Massa seca ($\bar{x} \pm \sigma$)
25	0,092 ± 0,006	0,024 ± 0,005
27	0,151 ± 0,008	0,033 ± 0,008
29	0,157 ± 0,004	0,040 ± 0,009
31	0,191 ± 0,005	0,052 ± 0,006
33	0,242 ± 0,010	0,058 ± 0,002
35	0,258 ± 0,011	0,073 ± 0,005
37	0,323 ± 0,008	0,090 ± 0,007
39	0,334 ± 0,009	0,103 ± 0,009
41	0,331 ± 0,014	0,111 ± 0,003
43	0,320 ± 0,009	0,131 ± 0,004
45	0,342 ± 0,013	0,148 ± 0,003
47	0,349 ± 0,011	0,158 ± 0,005
49	0,325 ± 0,004	0,161 ± 0,006
51	0,307 ± 0,011	0,149 ± 0,004
Q	0,126 ± 0,009	0,120 ± 0,005

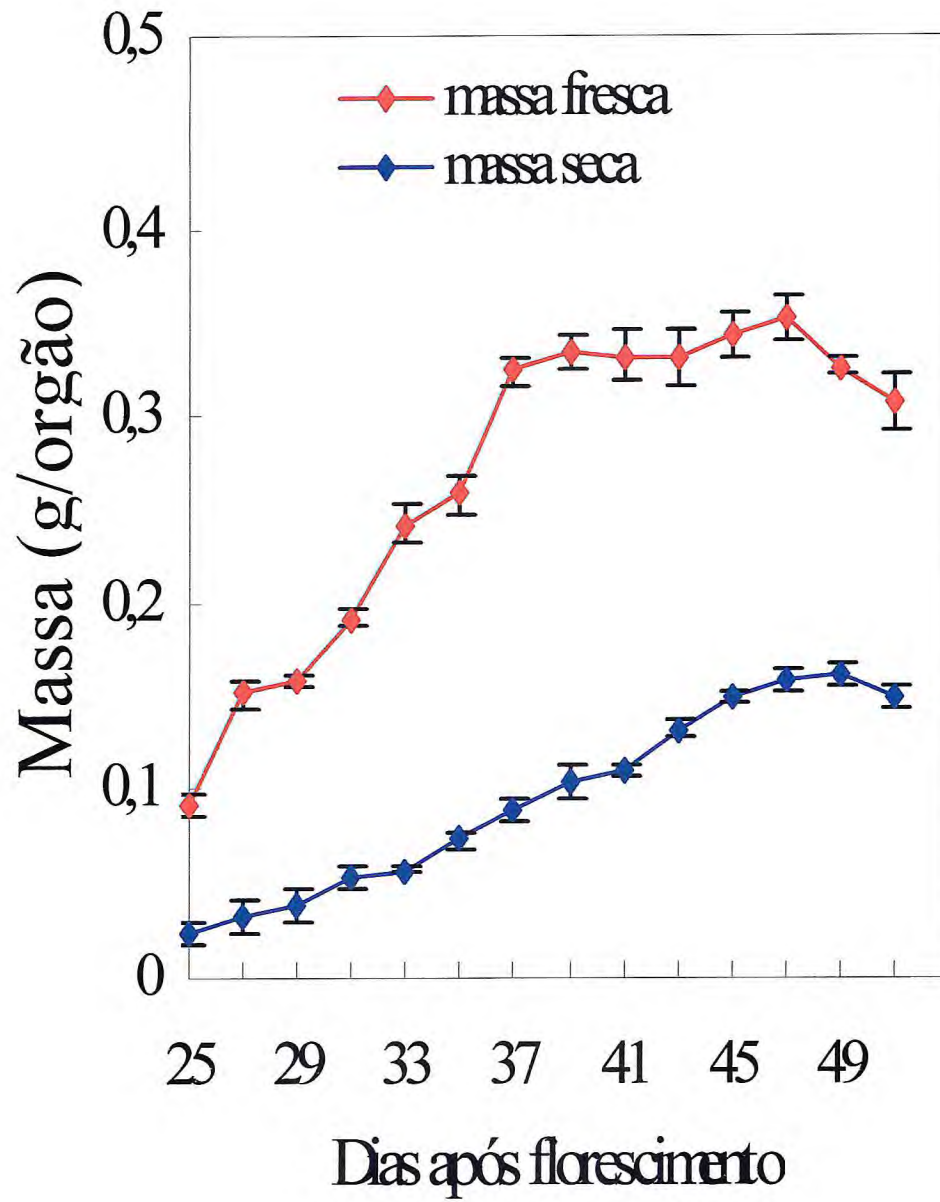


FIGURA 9- Curva de massa fresca (g/orgão) e massa seca (g/orgão) da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento.

TABELA 7 – Massa fresca (g/órgão) e massa seca (g/órgão) do tegumento da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento. Os valores são a média de pelo menos vinte medidas independentes.

DAF	Massa fresca ($\bar{x} \pm \sigma$)	Massa Seca ($\bar{x} \pm \sigma$)
25	0,049 ± 0,006	0,016 ± 0,002
27	0,061 ± 0,004	0,019 ± 0,002
29	0,065 ± 0,004	0,020 ± 0,002
31	0,077 ± 0,007	0,024 ± 0,002
33	0,082 ± 0,005	0,027 ± 0,002
35	0,089 ± 0,005	0,029 ± 0,002
37	0,098 ± 0,005	0,036 ± 0,004
39	0,098 ± 0,005	0,040 ± 0,004
41	0,099 ± 0,005	0,044 ± 0,005
43	0,097 ± 0,004	0,058 ± 0,003
45	0,100 ± 0,003	0,063 ± 0,002
47	0,106 ± 0,005	0,068 ± 0,002
49	0,105 ± 0,002	0,063 ± 0,002
51	0,090 ± 0,004	0,055 ± 0,003
Q	0,070 ± 0,005	0,045 ± 0,002

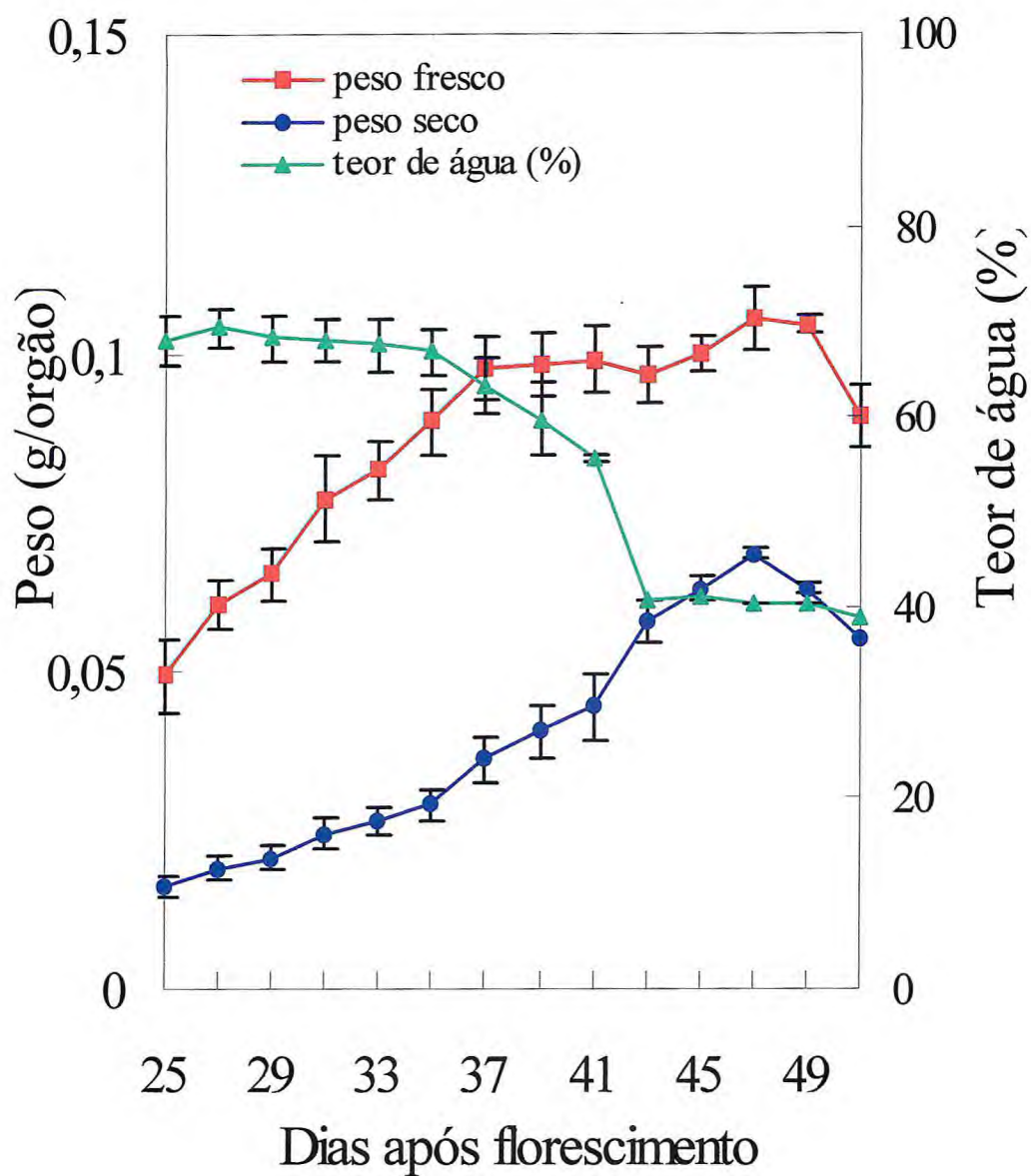


FIGURA 10- Curva de massa fresca (g/órgão) e massa seca (g/órgão) do tegumento da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

TABELA 8 – Massa fresca (g/órgão) e massa seca (g/órgão) do endosperma da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento. Os valores são a média de pelo menos vinte medidas independentes.

DAF	Massa fresca ($\bar{x} \pm \sigma$)	Massa Seca ($\bar{x} \pm \sigma$)
25	0,049 ± 0,006	0,004 ± 0,002
27	0,061 ± 0,004	0,007 ± 0,002
29	0,065 ± 0,004	0,009 ± 0,002
31	0,077 ± 0,007	0,014 ± 0,002
33	0,082 ± 0,005	0,015 ± 0,002
35	0,089 ± 0,005	0,020 ± 0,002
37	0,098 ± 0,005	0,026 ± 0,004
39	0,098 ± 0,005	0,033 ± 0,004
41	0,099 ± 0,005	0,037 ± 0,005
43	0,097 ± 0,004	0,037 ± 0,003
45	0,100 ± 0,003	0,040 ± 0,002
47	0,106 ± 0,005	0,047 ± 0,002
49	0,105 ± 0,002	0,057 ± 0,002
51	0,090 ± 0,003	0,055 ± 0,004
Q	0,070 ± 0,005	0,053 ± 0,002

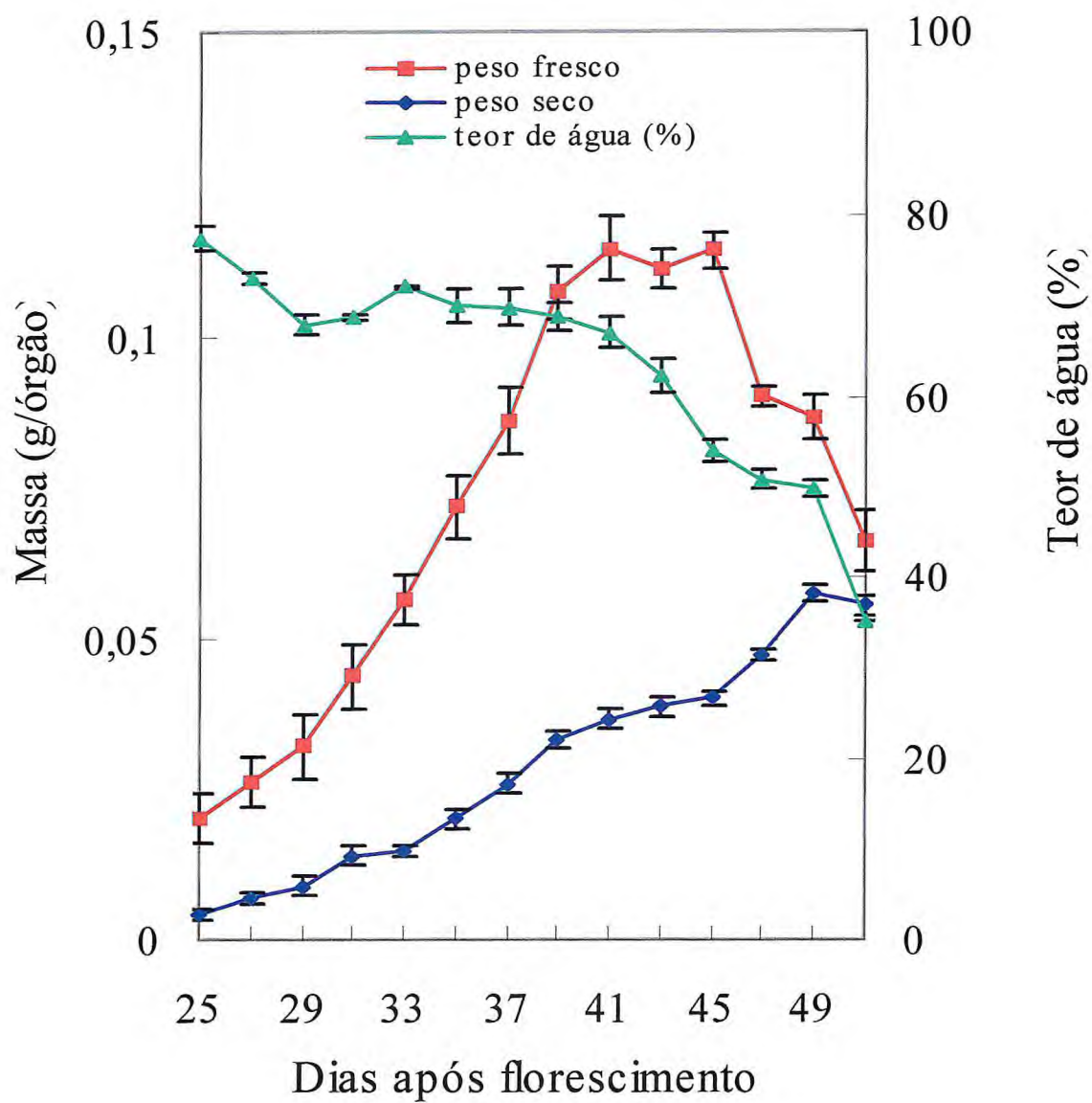


FIGURA 11- Curva de massa fresca (g/órgão) e massa seca (g/órgão) do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

TABELA 9 – Massa fresca (g/órgão) e massa seca (g/órgão) dos cotilédones da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento. Os valores são a média de pelo menos vinte sementes.

DAF	Massa fresca ($\bar{x} \pm \sigma$)	Massa Seca ($\bar{x} \pm \sigma$)
25	0,030 \pm 0,006	0,004 \pm 0,001
27	0,046 \pm 0,003	0,007 \pm 0,001
29	0,051 \pm 0,003	0,010 \pm 0,002
31	0,059 \pm 0,004	0,014 \pm 0,002
33	0,071 \pm 0,004	0,016 \pm 0,004
35	0,073 \pm 0,005	0,024 \pm 0,003
37	0,084 \pm 0,005	0,028 \pm 0,005
39	0,089 \pm 0,005	0,030 \pm 0,004
41	0,088 \pm 0,004	0,031 \pm 0,005
43	0,083 \pm 0,004	0,035 \pm 0,003
45	0,095 \pm 0,003	0,045 \pm 0,006
47	0,090 \pm 0,005	0,043 \pm 0,003
49	0,085 \pm 0,006	0,041 \pm 0,003
51	0,079 \pm 0,005	0,036 \pm 0,003
Q	0,044 \pm 0,003	0,028 \pm 0,005

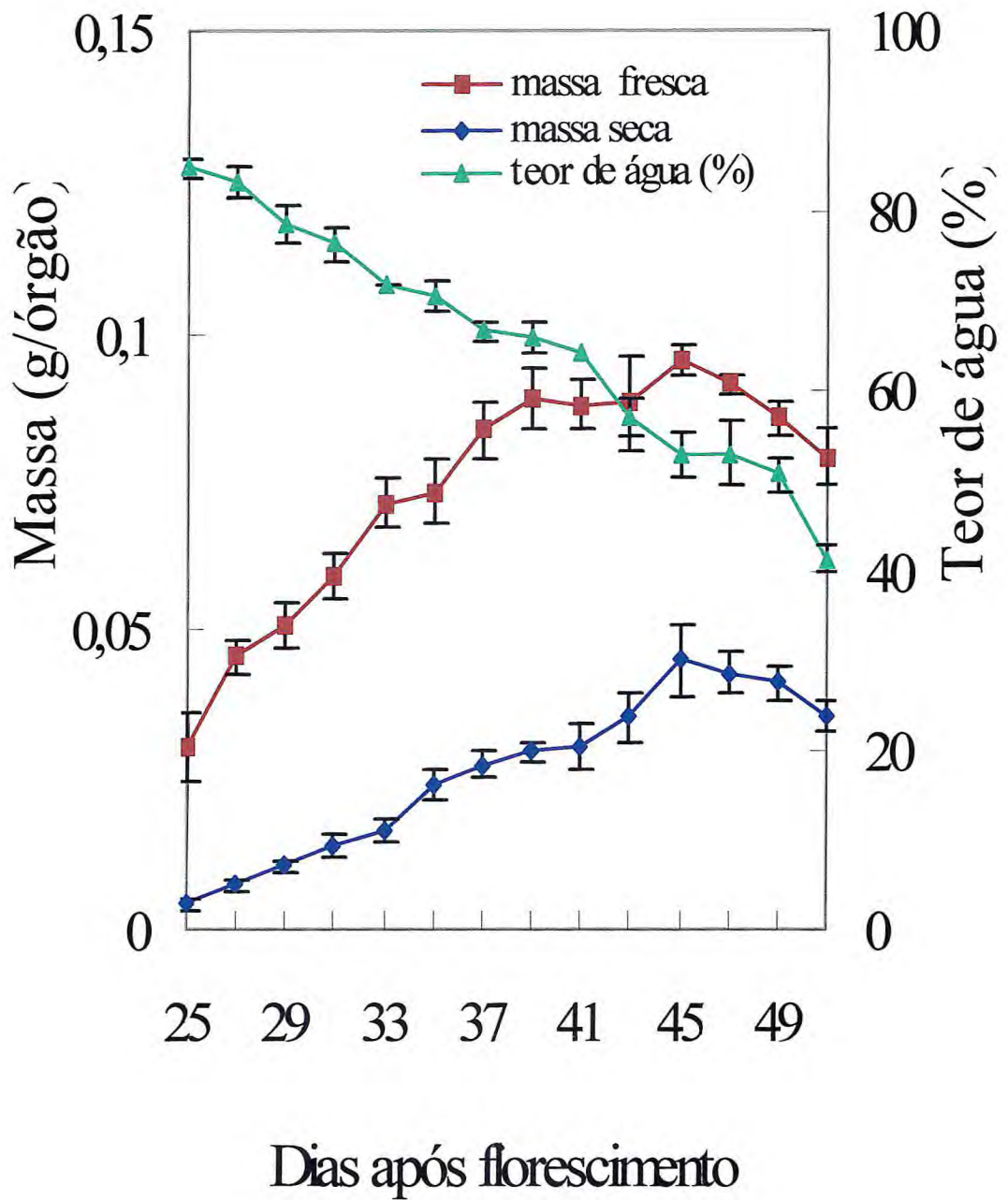


FIGURA 12- Curva de massa fresca (g/órgão) e massa seca (g/órgão) dos cotilédones da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

A variação da massa fresca e massa seca da semente de *Caesalpinia pulcherrima* é similar à de outras sementes de leguminosas já estudadas, caracterizando-se inicialmente por uma etapa de absorção de água seguida por uma etapa de perda brusca. O comportamento foi semelhante para tegumento, cotilédones e endosperma, onde observa-se um aumento brusco na massa fresca até o 39° DAF seguido de um discreto aumento até o 45° DAF. Um decréscimo pronunciado na massa fresca é observado entre o 45° e 51° DAF.

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 (embriogênese). A seguir, verifica-se um aumento contínuo e rápido na matéria seca até atingir o valor máximo. Em geral, pode-se afirmar que a semente deve atingir a sua máxima qualidade fisiológica quando o conteúdo de matéria seca for máximo. É importante observar que durante esta fase de intenso acúmulo de matéria seca, o teor de água da semente permanece alto, visto ser a água o veículo responsável pela translocação do material fotossintetizado da planta para a semente. 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.

O desenvolvimento da semente de *Caesalpinia pulcherrima*, como nas leguminosas, apresenta três fases bem características: morfogênese, fase de maturação ou armazenamento e fase de secagem ou maturação tardia (BAUD *et al.*, 2002; JAKOBSEN *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 1999).

5.1.3-Análise química do endosperma de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento

Durante o desenvolvimento do endosperma ocorreu uma redução quase linear no teor de água iniciando com um percentual em torno de 80 % no 25° DAF e decrescendo ao longo do processo para 40 % (49° DAF) (Figura 11).

Na semente quiescente observou-se uma redução ainda maior no teor de água para o tegumento, endosperma e cotilédones (10%, 11% e 7% respectivamente) (Figuras 10, 11 e 12). No entanto, com relação a massa seca dos três tecidos observa-se um aumento crescente durante todo o processo, atingindo um valor em torno de 80% na semente quiescente.

O teor de cinzas para o endosperma em desenvolvimento apresentou um valor de 0,014 mg/órgão no 25° DAF, seguido de um aumento até atingir um valor máximo de 0,58

mg/órgão no 41° DAF, decrescendo no 51° DAF para 0,40 mg/órgão, correspondendo a 0,73 % da massa seca (Tabela 10 e Figura 13).

O endosperma da semente de *Caesalpinia pulcherrima*, apresentou no 25° DAF um teor lipídico de 0,95 mg/órgão com um decréscimo até o 35° DAF (0,30 mg/órgão). Observou-se então, um aumento até um valor máximo de 0,79 mg/órgão (45° DAF), com o teor lipídico decrescendo para um valor de 0,46 mg/órgão (51° DAF) e 0,19 mg/órgão na semente quiescente. Com relação a massa seca, esses valores corresponderam a 0,8% (51° DAF) e 0,36% na semente quiescente (Tabela 10 e Figura 13).

Aos 25 dias do início do desenvolvimento da semente de *C. pulcherrima*, o endosperma apresentou um teor protéico de apenas 0,33 mg/órgão. Esse valor aumenta gradualmente, à medida que o processo continua, atingindo um valor máximo no 39° DAF de 9,49 mg/órgão. Posteriormente, observa-se uma redução para 4,48 mg/órgão no 51° DAF, correspondendo a 8% da massa seca acumulada (Tabela 10 e Figura 13).

O tecido endospérmico apresentou no 25° DAF, uma quantidade de carboidrato total de 2,7 mg/órgão. A quantidade de carboidrato acumulada no tecido ocorreu de forma contínua, até o final da maturação (51° DAF), quando o endosperma apresentou uma quantidade de carboidrato total de 49,9 mg/órgão, o que corresponde a 91 % da massa seca do tecido (Tabela 10 e Figura 13).

O percentual de carboidrato total obtido para o endosperma da semente quiescente de *C. pulcherrima* está próximo do encontrado para a goma endospérmica de *Delonix regia* (MATOS, 2000) e *Schizolobium parahybae* (93,5% e 95,25% respectivamente). Valores de proteína total bem inferiores foram obtidos para a goma endospérmica de *Cyamopsis tetragonolobus* (GYNTHER, 1984), *Parkinsonia aculeata* (GARROS-ROSA, 2000), *Schizolobium parahybae* (MATOS, 2000) e *Adenantha pavonina* (TAVARES, 1998) (5%, 4,5%, 2,21% e 1,68%, respectivamente).

TABELA 10– Teores de cinza (mg/órgão), proteína total (mg/órgão), lipídio (mg/órgão) e carboidrato total (mg/órgão) do endosperma da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento. O teor de carboidrato total foi obtido por diferença e expresso em porcentagem com relação a massa seca do endosperma. Os valores são a média de pelo menos três análises.

DAF	Proteína ($\bar{x} \pm \sigma$)	Lipídio ($\bar{x} \pm \sigma$)	Cinzas ($\bar{x} \pm \sigma$)	Carboidrato total (%)
25	0,33 ± 0,016	0,95 ± 0,052	0,014 ± 0,002	67,5
27	1,96 ± 0,095	0,69 ± 0,122	0,050 ± 0,005	61,5
29	2,30 ± 0,199	0,47 ± 0,001	0,080 ± 0,003	68,3
31	3,53 ± 0,174	0,29 ± 0,171	0,18 ± 0,012	71,0
33	3,06 ± 0,120	0,36 ± 0,012	0,21 ± 0,030	75,8
35	4,21 ± 0,665	0,37 ± 0,039	0,35 ± 0,117	75,3
37	5,86 ± 0,180	0,58 ± 0,149	0,44 ± 0,025	73,5
39	8,83 ± 0,155	0,76 ± 0,081	0,54 ± 0,019	67,3
41	7,66 ± 1,044	0,56 ± 0,128	0,58 ± 0,043	76,2
43	7,94 ± 0,79	0,37 ± 0,137	0,37 ± 0,040	76,5
45	5,53 ± 0,721	0,68 ± 0,269	0,36 ± 0,013	74,3
47	4,79 ± 0,721	0,62 ± 0,139	0,40 ± 0,031	87,6
49	5,16 ± 0,811	0,46 ± 0,039	0,48 ± 0,044	89,3

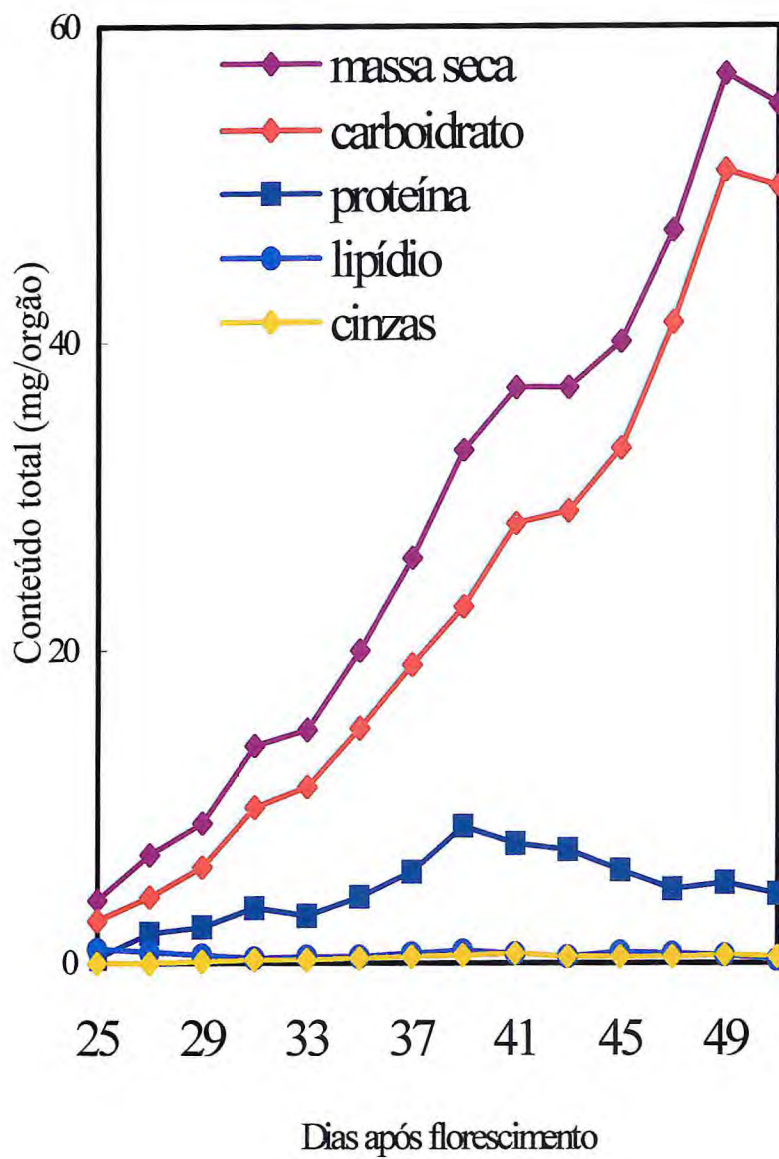


FIGURA 13- Teores de cinza (mg/órgão), proteína total (mg/órgão), lipídio (mg/órgão) e carboidrato total (mg/órgão) do endosperma da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento.

5.1.4- Análise química dos cotilédones da semente de *Caesalpinia pulcherrima*

Os cotilédones apresentaram um teor de cinzas no 25° DAF de 0,12 mg/órgão, com um aumento no 39° DAF para um valor de 2,69 mg/órgão. No entanto, esse valor cai para 2,27 mg/órgão no 49° DAF dias e, na semente quiescente observou-se uma diminuição para 1,66 mg/órgão (Tabela 11 e Figura 14)

A quantidade de lipídio total nos cotilédones, aumenta continuamente até o 43° DAF (19,97 mg/órgão), com um suave decréscimo até o final da maturação para 11,1 mg/órgão na semente quiescente (Tabela 11 e Figura 14).

O acúmulo de proteína nos cotilédones é iniciado nos primeiros estágios do desenvolvimento da semente, onde podemos observar um valor inicial de 0,78 mg/órgão, com um aumento progressivo até atingir o valor de 69,23 mg/órgão no 41° DAF. Na fase final do processo (41°- 49° DAF), observou-se um decréscimo no teor de proteína total para um valor de 39,06 mg/órgão no 49° DAF e 23,13 mg/órgão na semente quiescente (Tabela 11 e Figura 14).

O acúmulo de carboidrato nos cotilédones em desenvolvimento ocorre de forma gradual e contínua, até atingir um valor máximo de 168,38 mg/órgão no 37° DAF. Então, observou-se ao final do processo um decréscimo para um valor de 38,06 mg/órgão aos 49° DAF e, posteriormente na semente quiescente este valor foi de 23,13 mg/órgão (Tabela 11 e Figura 14).

TABELA 11– Teores de cinza (mg/órgão), proteína total (mg/órgão), lipídio (mg/órgão) e carboidrato total (mg/órgão) dos cotilédones da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento. O teor de carboidrato total foi obtido por diferença entre a massa seca do cotilédone e os outros constituintes diferença e expresso em percentagem com relação a massa seca do endosperma. Os valores são a média de pelo menos três análises.

DAF	Proteína ($x \pm \sigma$)	Lipídio ($x \pm \sigma$)	Cinzas ($x \pm \sigma$)	Carboidrato total (%)
25	$0,389 \pm 0,084$	$0,46 \pm 0,038$	$0,12 \pm 0,009$	75,7
27	$0,304 \pm 0,034$	$2,14 \pm 0,316$	$0,20 \pm 0,019$	38,7
29	$0,486 \pm 0,019$	$3,51 \pm 0,009$	$0,29 \pm 0,009$	57,1
31	$0,744 \pm 0,037$	$5,12 \pm 0,023$	$0,47 \pm 0,016$	54,7
33	$0,842 \pm 0,095$	$5,92 \pm 0,061$	$0,55 \pm 0,082$	54,2
35	$1,83 \pm 0,083$	$9,44 \pm 0,291$	$0,88 \pm 0,068$	49,4
37	$4,07 \pm 0,098$	$10,94 \pm 0,482$	$1,07 \pm 0,067$	42,6
39	$3,94 \pm 0,056$	$12,25 \pm 0,247$	$1,37 \pm 0,026$	41,4
41	$3,96 \pm 0,169$	$12,99 \pm 0,009$	$1,42 \pm 0,054$	40,7
43	$3,79 \pm 0,079$	$12,94 \pm 0,09$	$1,87 \pm 0,086$	46,8
45	$4,31 \pm 0,254$	$14,84 \pm 0,122$	$2,41 \pm 0,099$	52,1
47	$4,72 \pm 0,098$	$14,14 \pm 0,143$	$2,29 \pm 0,084$	50,8
49	$3,81 \pm 0,117$	$13,19 \pm 0,169$	$2,27 \pm 0,113$	53,0
Q	$2,1 \pm 0,090$	$5,64 \pm 0,079$	$1,56 \pm 0,015$	66,7

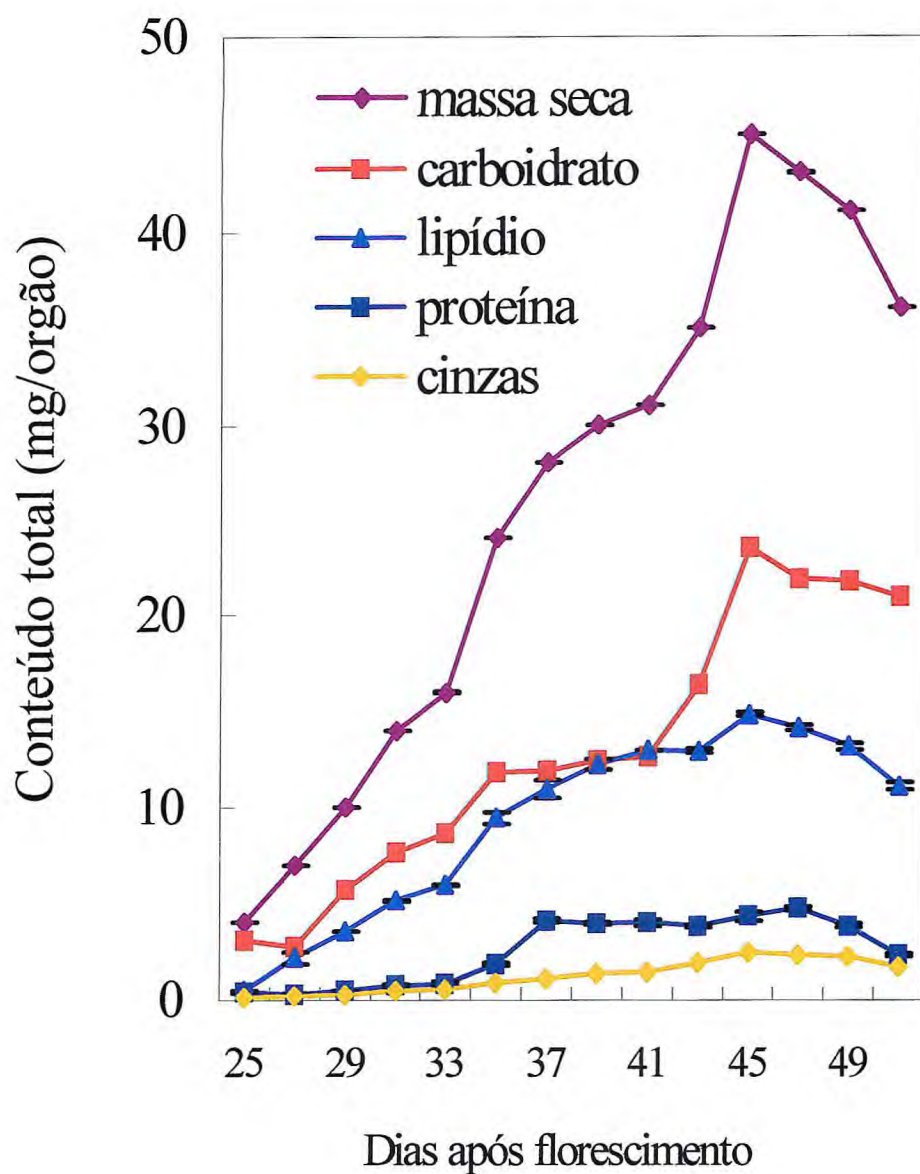


FIGURA 14- Teores de cinza (mg/órgão), proteína total (mg/órgão), lipídio (mg/órgão) e carboidrato total (mg/órgão) dos cotilédones da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento.

5.2- Análise morfológica da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento.

A semente de *Caesalpinia pulcherrima* apresenta o tegumento formado pelas células em paliçada, logo abaixo se encontra uma camada de células com paredes espessas, os osteoesclereídeos, uma camada de esclereídeos formada por células com paredes lignificadas e logo abaixo o endosperma (Figura 15). Esta semente é do tipo endospermica ou albuminosa, ou seja, o endosperma permanece na semente quiescente, não é consumido durante o desenvolvimento do embrião (BELTRATI, 1995).

Entre o 25°-29° DAF a semente corada com azul de toluidina (AT), apresentou as células da camada paliçada pouco alongadas com núcleo bastante evidente, presença de parede celular metacromática no tegumento e principalmente nas células do endosperma (Figuras 16 e 17). A coloração arroxeadada apresentada no corte transversal da semente do 25°-29° DAF, se deve ao fenômeno da metacromasia que é comum a inúmeros corantes catiônicos incluindo o AT. Isso faz com que a disponibilidade de radicais aniônicos e proximidade dos mesmos no substrato a ser corado, seja estimada pela visualização da cor obtida, que em função dessas interações passa do verde (monômeros de AT), para azul arroxeadado e róseo à medida que mais moléculas do corante se empilham no substrato (VIDAL, 1987). A medida que a semente amadurece a coloração das paredes celulares das células do tegumento vão ficando mais esverdeadas indicando a pouca disponibilidade de material aniônico presente nas pectinas. No 39° DAF as células da paliçada estão alongadas e se observa a presença basal dos núcleos (Figura 15). Nesta camada também já é nítida a linha lúcida, os osteoesclereídeos e os esclereídeos apresentam paredes mais espessas e coradas em azul (esverdeado).

A presença de amido foi identificada através da reação do PAS e lugol no 25° e 29° DAF na camada de esclereídeos e em algumas células cotiledonares (Figuras 18 e 19). Como já descrito em ervilha (Van DONJEN *et al.*, 2003; ROCHAT & BOUTIN, 1992) a presença deste amido transitório é utilizado durante o desenvolvimento do embrião. Os autores descrevem a participação do tegumento na nutrição do embrião durante o desenvolvimento da semente.

O corte transversal da semente do 25° DAF quando submetido a reação com ácido periódico de Schiff (PAS) mostra que o endosperma apresenta paredes celulares finas e com grandes espaços citoplasmáticos (Figura 18), evidenciando que a deposição da galactomanana encontra-se em sua fase inicial (Figura 19). À partir do 29° DAF (Figura 20) observa-se um aumento acentuado na deposição da galactomanana, com as paredes celulares tornando-se espessas (Figura 20 e 21). No 49° DAF (Figura 20) e na semente quiescente (Figura 21),

observou-se um padrão típico da semente que possui um endosperma rico em polissacarídeo neutro, provavelmente galactomanana. Nestas sementes, as paredes celulares do endosperma estão bastante espessas ocupando quase todo o citoplasma (Figura 22). Os espaços em branco, PAS negativo (Figura 21 e 22), foram descritos como sendo um core protéico (BEWLEY & BLACK, 1994). Essa região foi corada pelo AT (Figura 23) e pelo XP (Figura 24).

A coloração com o Xylidine Ponceau (XP) revelou a presença de um núcleo protéico na região do endosperma (Figura 23) e o preenchimento das células cotiledonares de glóbulos de proteína. No 29º DAF observa-se no citoplasma das células cotiledonares poucos grânulos corados intensamente pelo XP (Figura 24). No 39º DAF a presença de grânulos protéicos corados é maior (Figura 25). No 41º DAF e na semente quiescente o citoplasma das células cotiledonares estão totalmente preenchidos (Figuras 26 e 27).

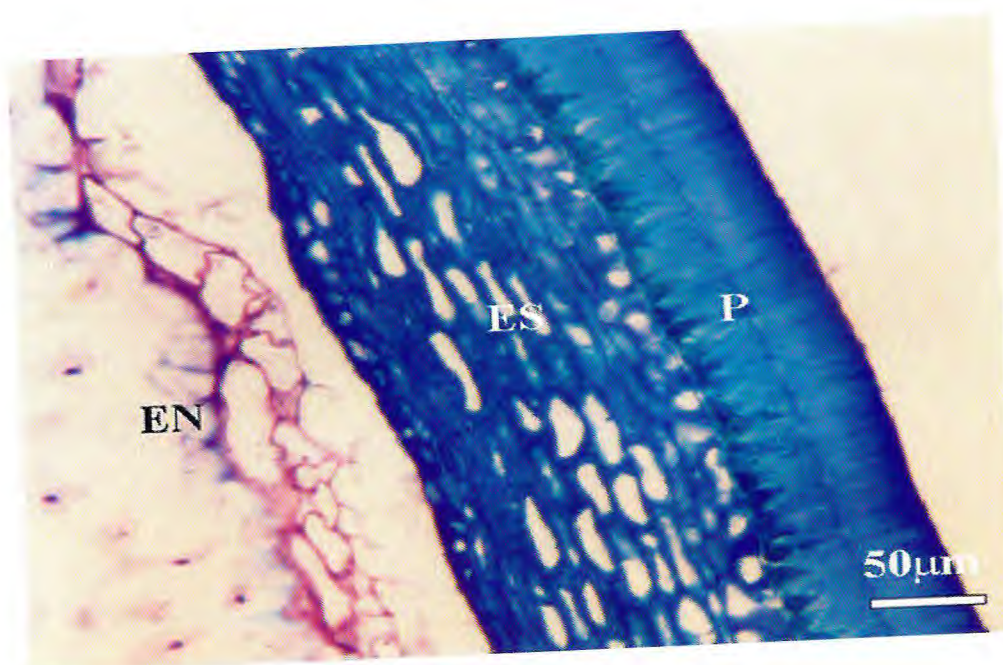


Figura 15-Corte transversal da semente de *C. pulcherrima* no 39° DAF corado com Azul de Toluidina pH 4,0. **P**: paliçada; **ES**: esclereídeo; **EN**: endosperma.

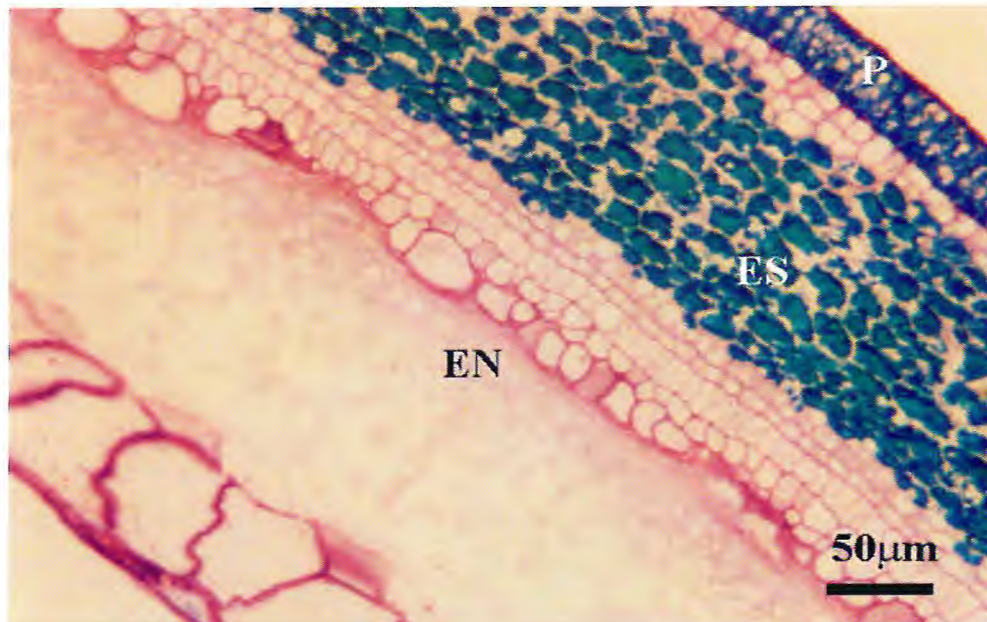


Figura 16-Corte transversal da semente de *C. pulcherrima* no 25° DAF corado com Azul de Toluidina pH 4,0. **P**: paliçada; **ES**: esclereídeo; **EN**: endosperma

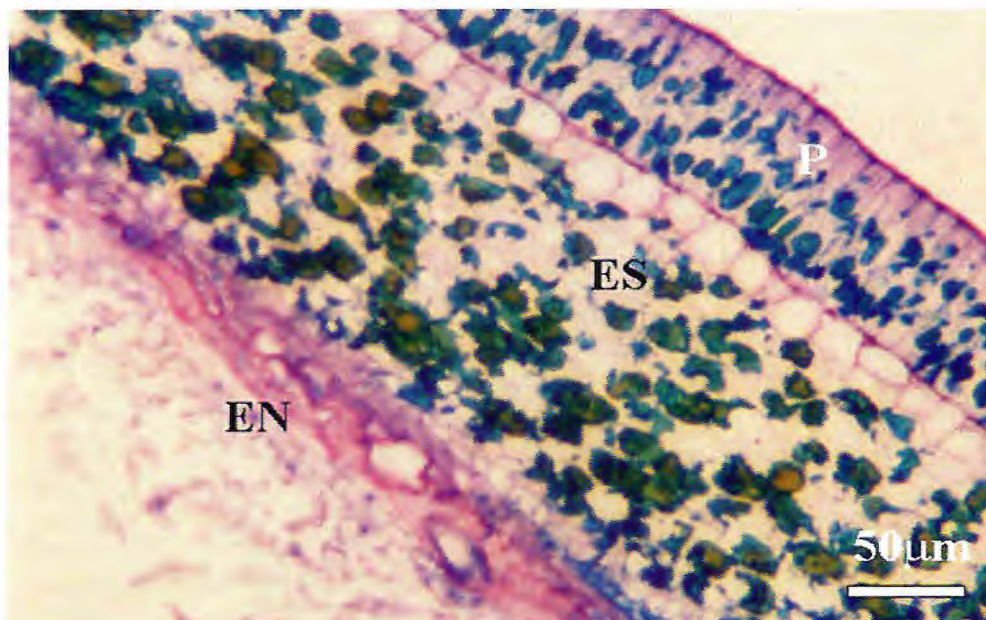


Figura 17-Corte transversal da semente de *C. pulcherrima* com 29° DAF corado com Azul de Toluidina pH 4,0. **P**: paliçada; **ES**: esclereídeo; **EN**: endosperma

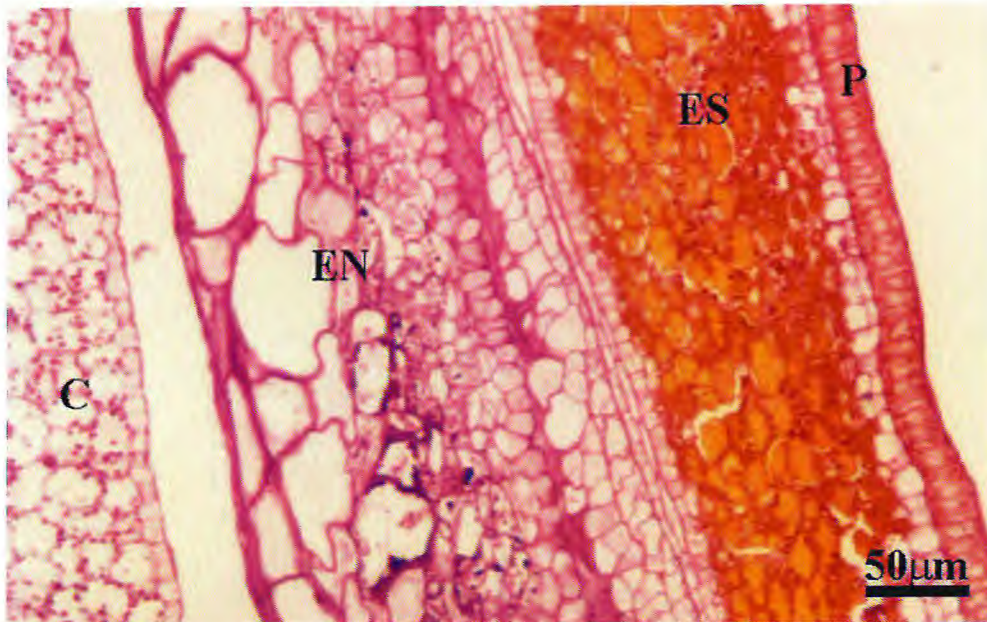


Figura 18-Corte transversal da semente de *C. pulcherrima* no 25º DAF submetida à reação do PAS. P: paliçada; ES: esclereídeo; (►): amido na região do esclereídeo; EN: endosperma; C:cotilédone.

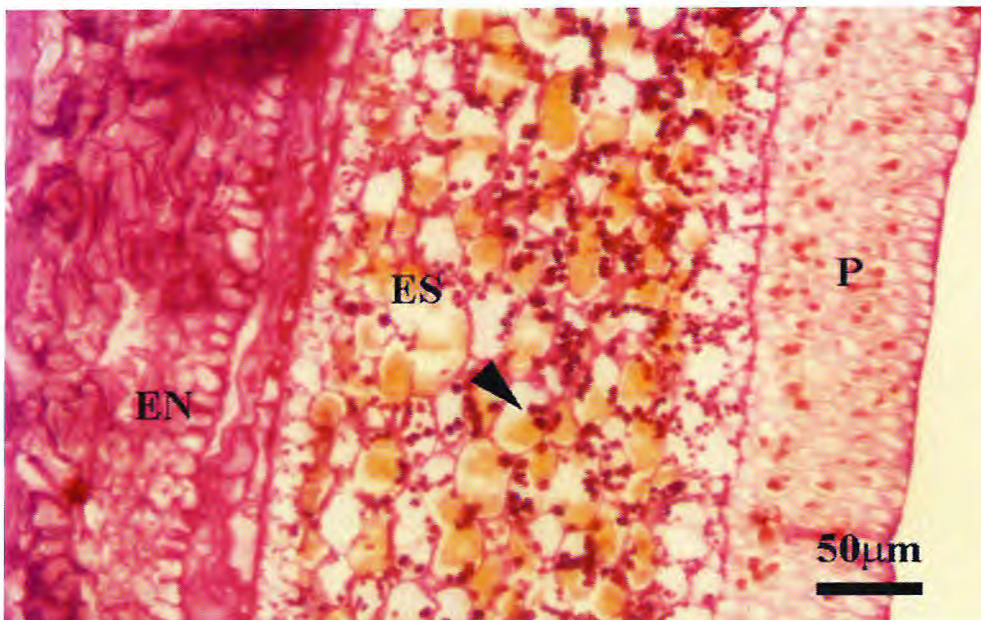


Figura 19-Corte transversal da semente de *C. pulcherrima* com 29º DAF submetida à reação do PAS. P: paliçada; ES: esclereídeo; (►): amido na região do esclereídeo; EN: endosperma.

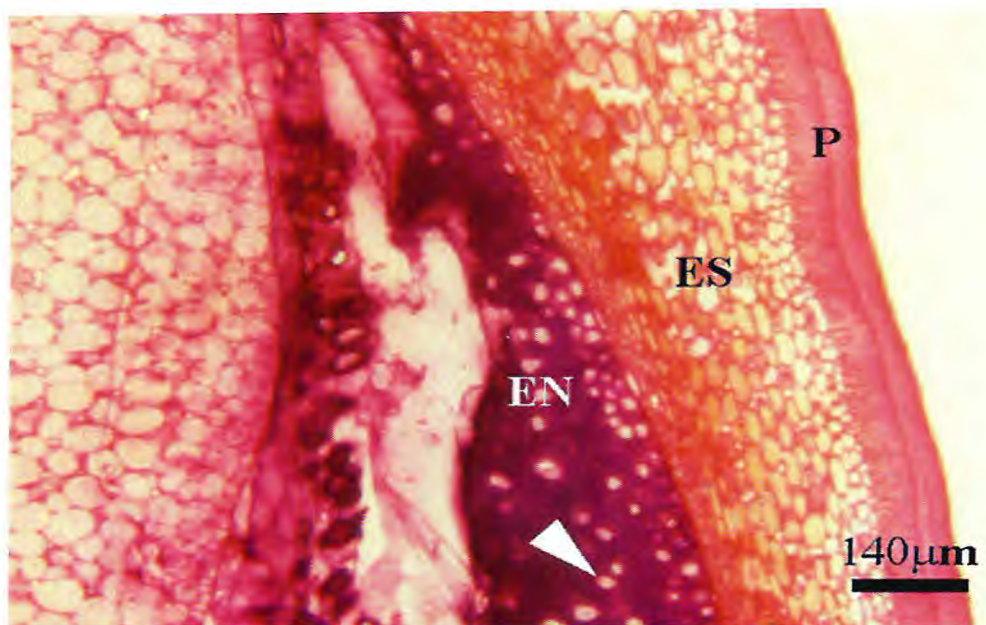


Figura 20-Corte transversal da semente de *C. pulcherrima* com 49° DAF submetida à reação do PAS. **P**: paliçada; **ES**: esclereídeo; **EN**: endosperma; (▶): região PAS negativo (núcleo protéico).

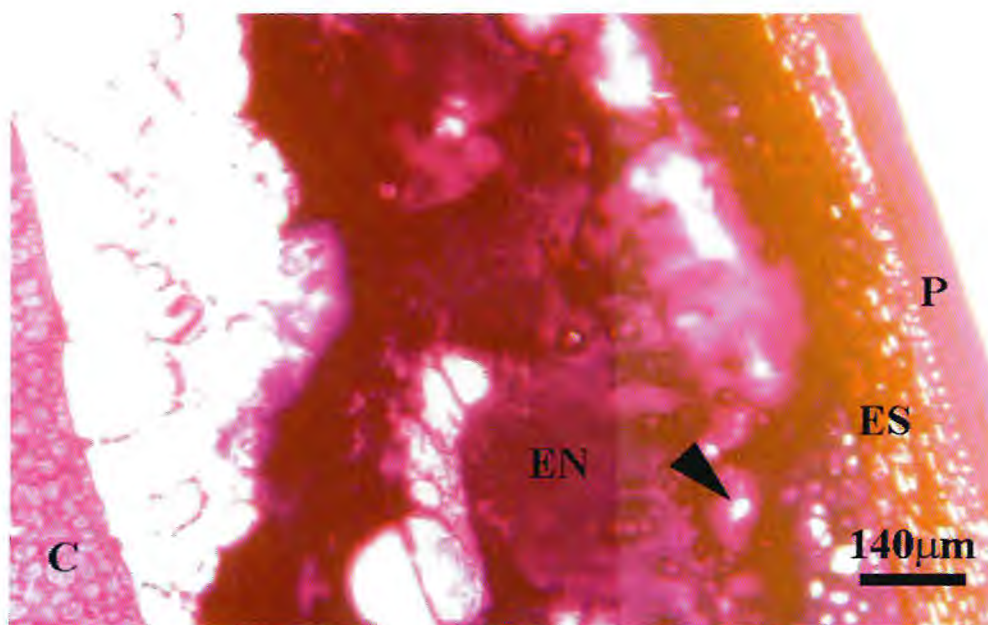


Figura 21-Corte transversal da semente quiescente de *C. pulcherrima* submetida à reação do PAS. **P**: paliçada; **ES**: esclereídeo; **EN**: endosperma; (▶): região PAS negativo (núcleo protéico).

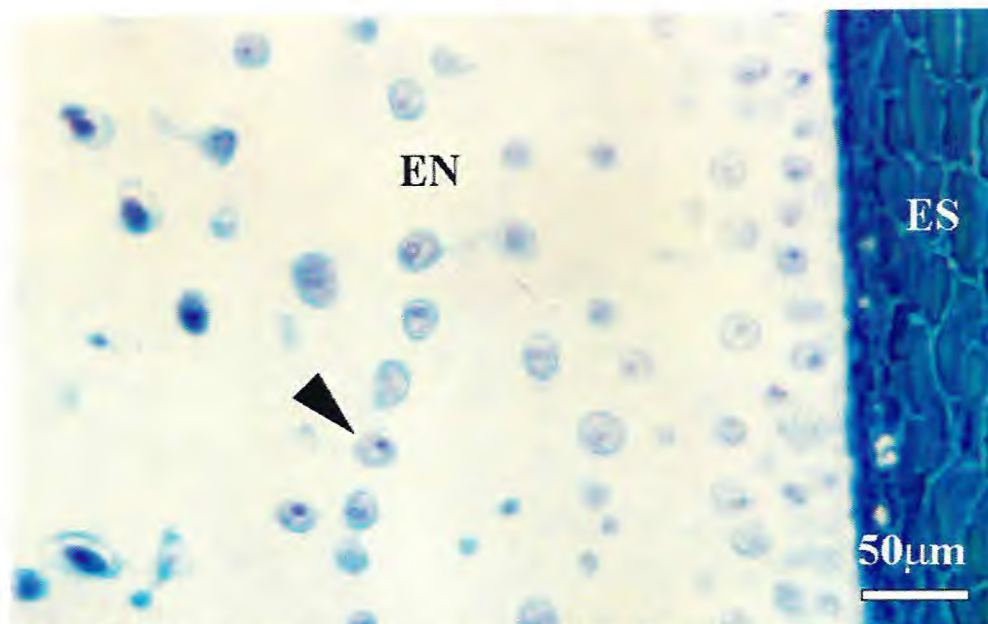


Figura 22- Corte transversal da semente de *C. pulcherrima* no 49° DAF corado com Azul de Toluidina pH 4,0. **ES:** esclereídeo; **EN:** endosperma; (►): núcleo protéico corado pelo Azul de Toluidina.

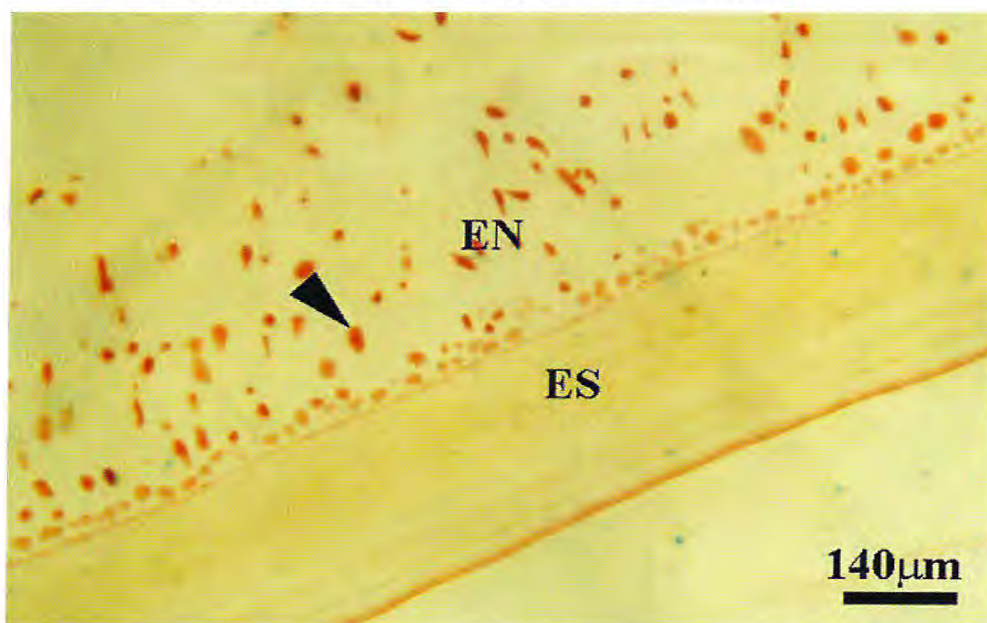


Figura 23- Corte transversal da semente de *C. pulcherrima* no 49° DAF corado com Xylidine Ponceau pH 2,5. **ES:** esclereídeo; **EN:** endosperma; (►): núcleo protéico corado pelo Xylidine Ponceau.

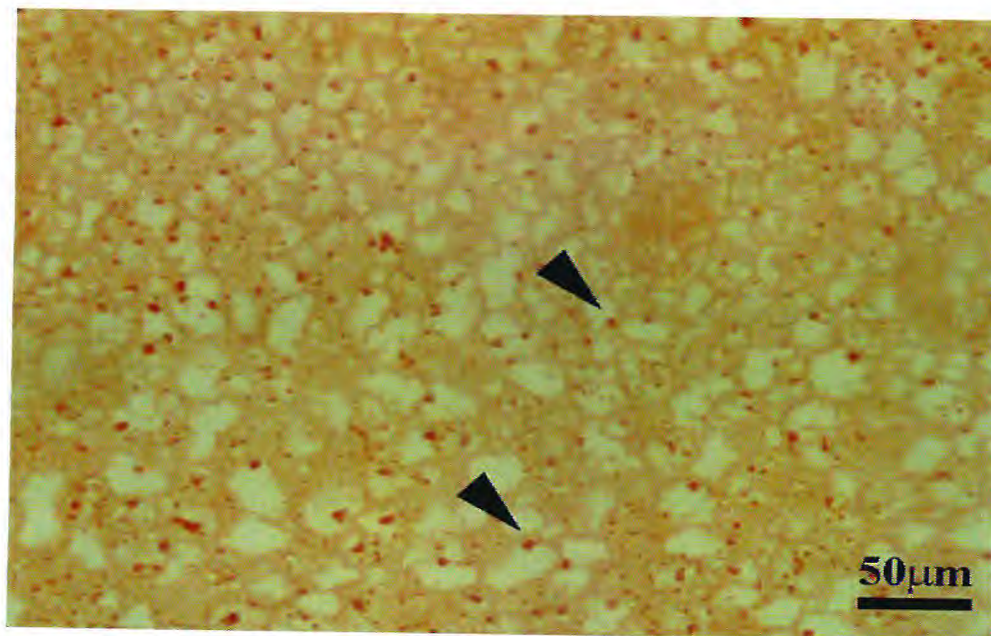


Figura 24-Corte transversal do cotilédone de *C. pulcherrima* no 29° DAF corado com Xylidine Ponceau pH 2,5. (►): glóbulo de proteína corado pelo Xylidine Ponceau.

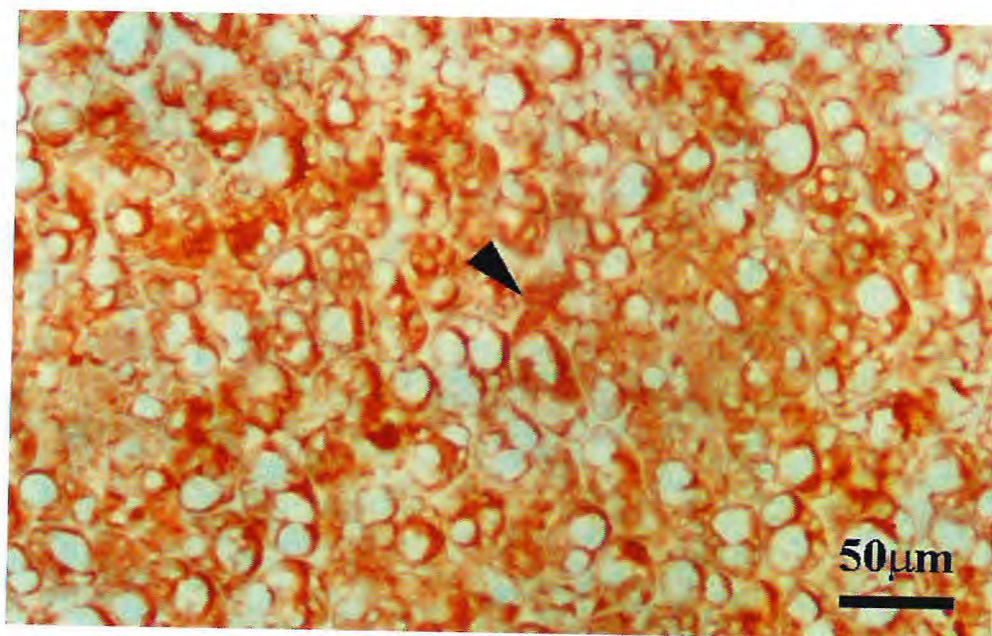


Figura 25-Corte transversal do cotilédone de *C. pulcherrima* no 39° DAF corado com Xylidine Ponceau pH 2,5. (►): células cotiledonares sendo preenchidas com proteínas.

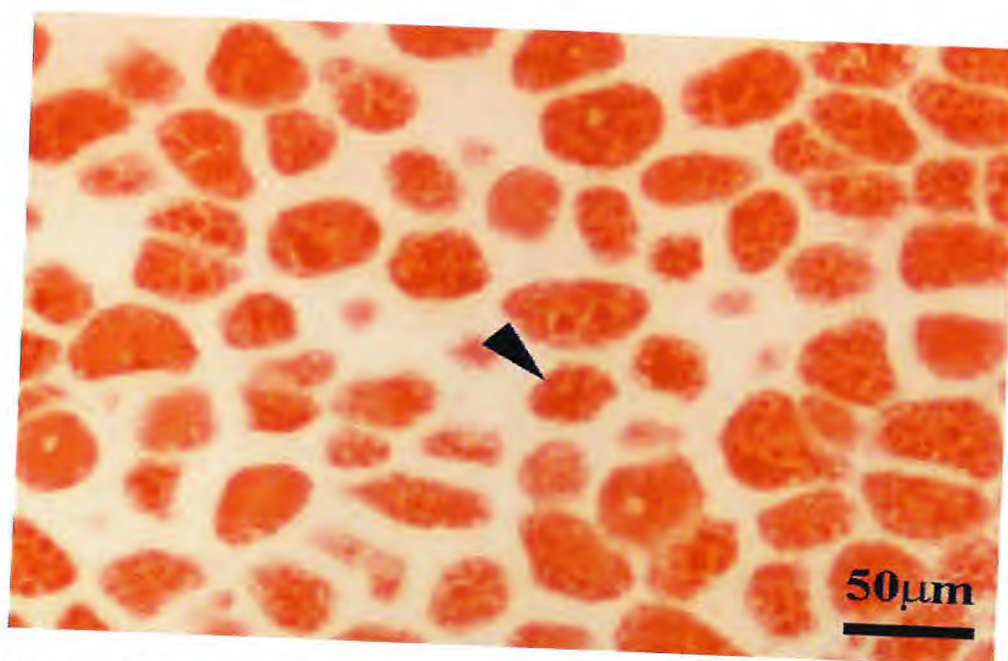


Figura 26-Corte transversal do cotilédone de *C. pulcherrima* no 41° DAF corado com Xylidine Ponceau pH 2,5. (►): células cotiledonares preenchidas com glóbulos protéicos.

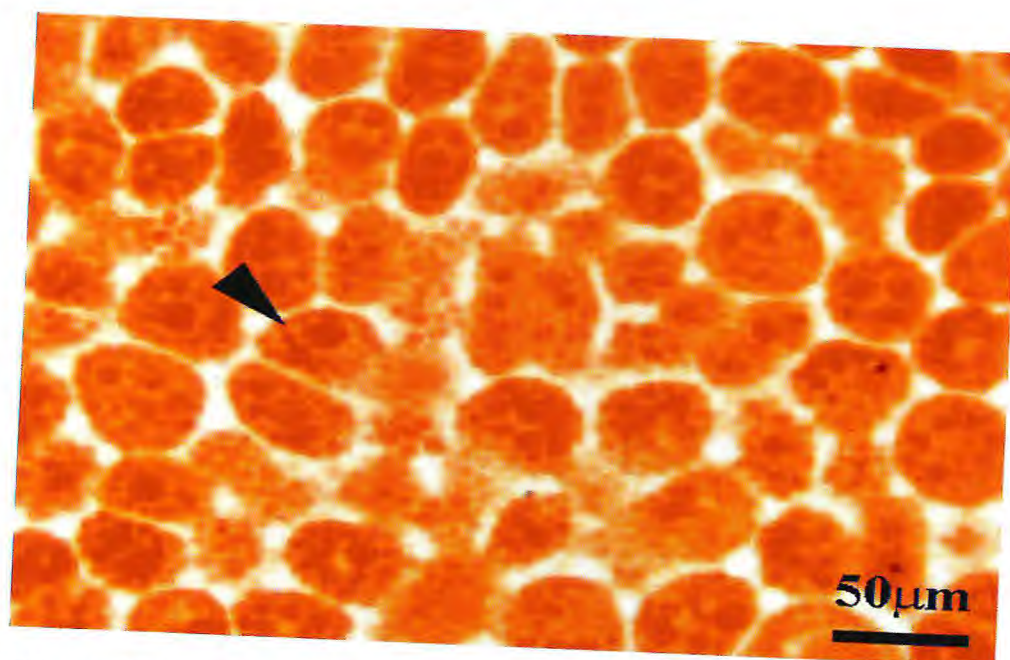


Figura 27-Corte transversal do cotilédone da semente quiescente de *C. pulcherrima* corado com Xylidine Ponceau pH 2,5. (►): células cotiledonares preenchidas com glóbulos protéicos.

5.3-Extração e obtenção dos polissacarídeos endospermicos da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento.

Os polissacarídeos endospermicos isolados da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento foram obtidos de acordo com o esquema da Figura 6. Foram obtidas três frações solúveis em água, designadas GM₁, GM₂ e GM₃, e duas frações obtidas por extração com NaOH 2M e 4M, as hemiceluloses e as mananas, respectivamente. Ao longo do desenvolvimento da semente foram escolhidos o 25°, 29°, 35°, 39°, 45° e 49° DAF e semente quiescente (Q) para a extração das diferentes frações polissacarídicas, possibilitando assim, acompanhar o acúmulo desses polissacarídeos no endosperma em desenvolvimento e posteriormente proceder ao estudo e caracterização das mesmas.

Praticamente, pode-se distinguir três classes principais de polissacarídeos de parede celular no endosperma de *C. pulcherrima*: galactomananas, hemiceluloses e mananas. Esses polissacarídeos apresentaram um acúmulo diferenciado ao longo do desenvolvimento do endosperma, como pode-se observar na Tabela 12 e Figura 28.

Nos estágios iniciais a quantidade de galactomanana extraída (GM₁+GM₂+GM₃) aumenta rapidamente de 2,17 mg/órgão (25° DAF) para 14,96 mg/órgão no 35° DAF, atingindo um valor máximo no 49° DAF (38,67 mg/órgão) para a seguir decrescer na semente quiescente (29,16 mg/órgão) (Tabela 12). Essa diminuição pode ser conseqüência das perdas que ocorrem durante o processo de fervura em que as sementes são submetidas. Com relação ao total de carboidrato extraído na semente do 49° DAF, esse valor corresponde a 81% e na semente quiescente cai para 74%.

Para as hemiceluloses observa-se um aumento na quantidade extraída a partir do 35° DAF (0,759 mg/órgão) para um valor de 8,01 mg/órgão no 45° DAF e na semente quiescente esse valor cai para 4,72 mg/órgão, correspondendo a 12% do total de carboidrato extraído.

A quantidade de manana extraída foi praticamente constante até 39° DAF (0,11-0,25 mg/órgão), com um aumento no 49° DAF (5,02 mg/órgão) e na semente quiescente (5,26 mg/órgão), correspondendo a 13% do total de carboidrato extraído.

Por esses resultados podemos afirmar que o tecido endospermico da semente de *Caesalpinia pulcherrima* é quase totalmente constituído por galactomananas.

TABELA 12- Polissacarídeos obtidos do endosperma (mg/órgão) da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento. As galactomananas compreendem as três frações (GM₁ + GM₂ + GM₃) solúveis em água. A soma das três frações polissacarídicas está expressa em percentagem com relação a massa seca do endosperma. Os valores são a média de pelo menos três extrações.

POLISSACARÍDEOS				
(mg/órgão)				
DAF	Galactomanana	Hemicelulose	Manana	Carboidrato Total
	($x \pm \sigma$)	($x \pm \sigma$)	($x \pm \sigma$)	(%)
25	2,171 ± 0,473	0,365 ± 0,021	0,113 ± 0,018	66,2
29	5,459 ± 0,664	0,5025 ± 0,007	0,074 ± 0,006	67
35	14,96 ± 0,864	0,759 ± 0,179	0,170 ± 0,028	79,4
39	21,716 ± 0,030	5,278 ± 0,054	0,252 ± 0,016	82,5
45	30,374 ± 1,439	8,013 ± 0,120	2,214 ± 0,206	100
49	38,675 ± 1,982	3,958 ± 0,211	5,025 ± 0,102	83,6
Q	29,157 ± 2,126	4,724 ± 0,789	5,259 ± 0,427	73,8

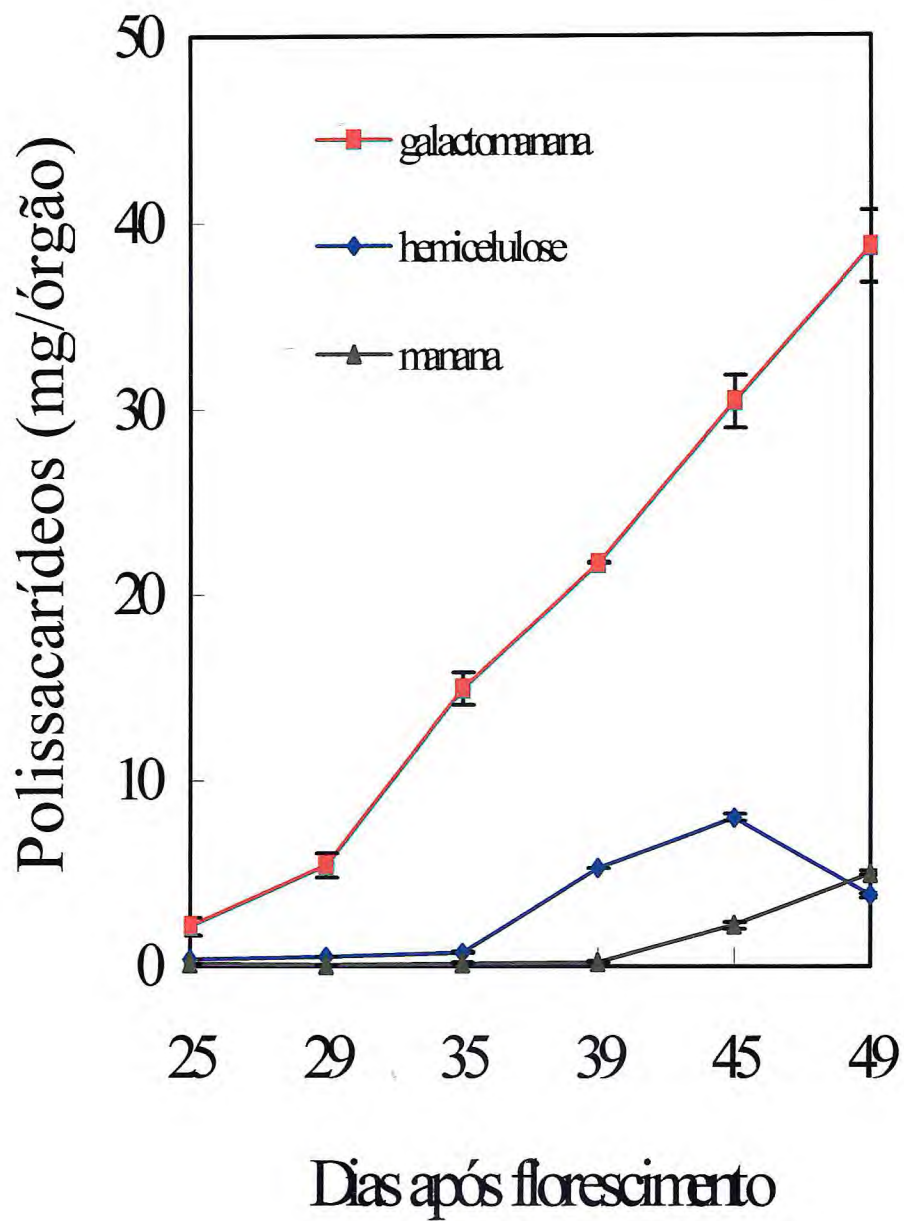


FIGURA 28- Polissacarídeos obtidos (mg/órgão) do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

5.4-Parâmetros físico-químicos para caracterização das galactomananas obtidas do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento

5.4.1- Cromatografia em camada delgada (CCD)

Galactomananas obtidas do endosperma em diferentes estágios de desenvolvimento foram submetidas a hidrólise com TFA com a finalidade de identificar seus açúcares constituintes (Figura 29). Como pode-se observar, os polissacarídeos do endosperma do 25°, 29°, 35°, 39°, 45° e 49° DAF, bem como da semente quiescente, liberaram por hidrólise apenas galactose e manose, os açúcares constituintes das galactomananas. Todos os açúcares apresentaram Rfs correspondentes aos Rfs dos padrões, manose (0,73) e galactose (0,365).

5.4.2-Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Para a determinação da massa molar das galactomananas foram realizadas várias cromatografias de permeação em gel utilizando detector de índice de refração (IR) e Ultravioleta (UV) a 280nm. Por essa técnica pode-se determinar a massa molar numérica média (M_n) e a massa molar ponderal média (M_w).

O cromatograma obtido por GPC da galactomanana do 25°, 29°, 35°, 39°, 45°, 49° DAF e Q está mostrado na Figura 30. Pelo perfil apresentado a galactomanana do 25° DAF apresentou o maior volume de eluição seguido da galactomanana do 29° e 35° DAF. As galactomananas do 35°, 39°, 45° e 49° DAF e Q, apresentaram volumes de eluição similares.

A massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e o índice de polidispersidade (M_w/M_n) das galactomananas obtidas do endosperma em diferentes estágios de maturação está mostrada na Tabela 13 e Figura 31. Pode-se observar um aumento crescente nas massas molares, M_w e M_n das galactomananas a partir do 25° DAF com um M_w de $7,05 \times 10^3$ g/mol seguido de um aumento brusco entre o 29° e 35° DAF. Esse aumento corresponde com o período de maior ganho de massa fresca do endosperma (Figura 11). Na fase final do processo (39°- 49° DAF) observa-se um aumento gradual da massa molar ponderal média (M_w) com um valor de $2,3 \times 10^5$ g/mol no 49° DAF e uma estabilização na massa fresca observada para o endosperma nesse período (Figuras 31 e 11).

A massa molar numérica média (M_n) e a massa molar ponderal média (M_w) determinadas para as galactomananas do 25°, 29°, 35°, 39°, 45°, 49° DAF e semente quiescente, corresponderam aos volumes de eluição observada no cromatograma para as

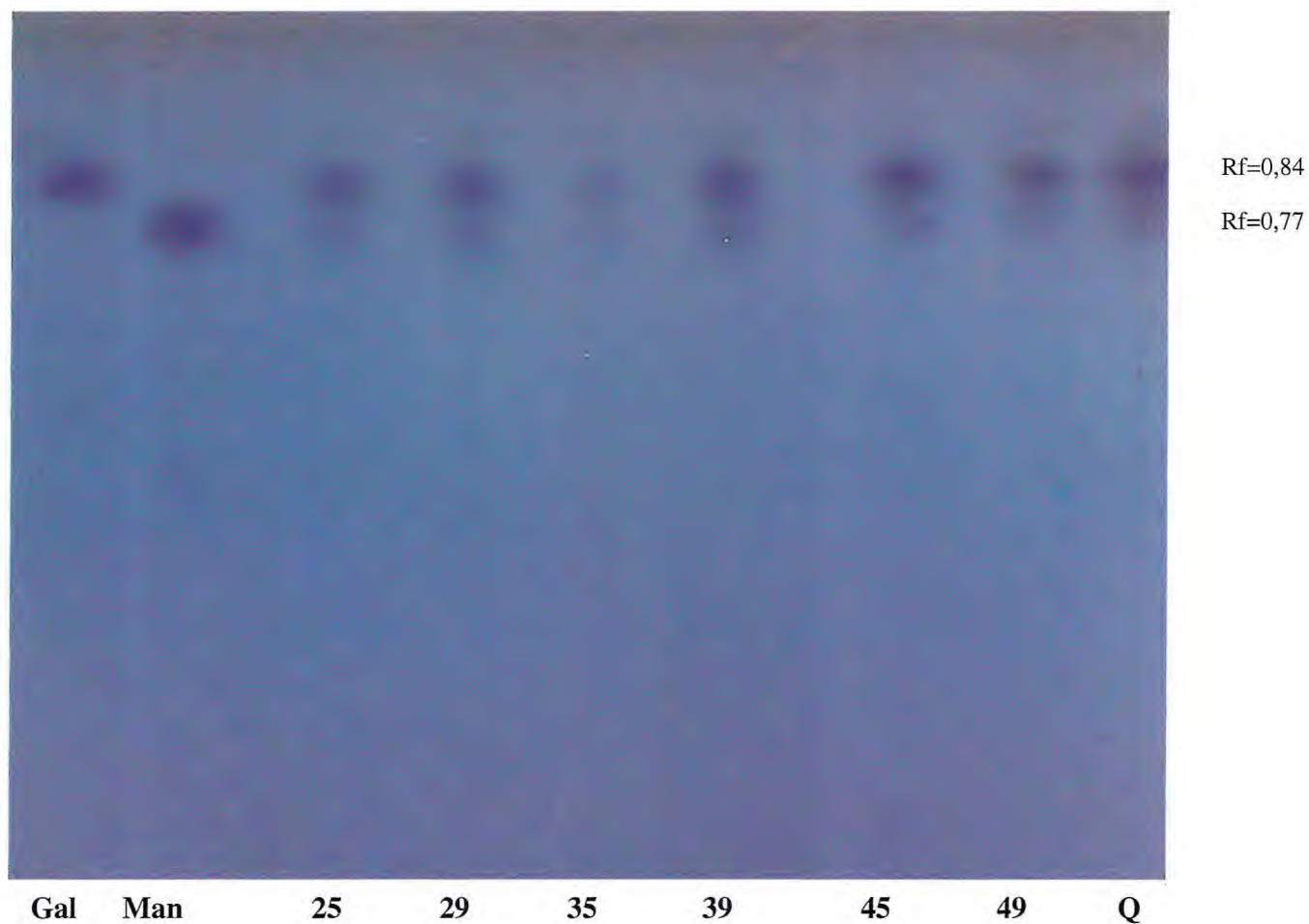


Figura 29- Cromatografia em camada delgada (CCD) das galactomananas da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento (25°, 29°, 35°, 39°, 45°, 49° DAF e semente madura (Q)).

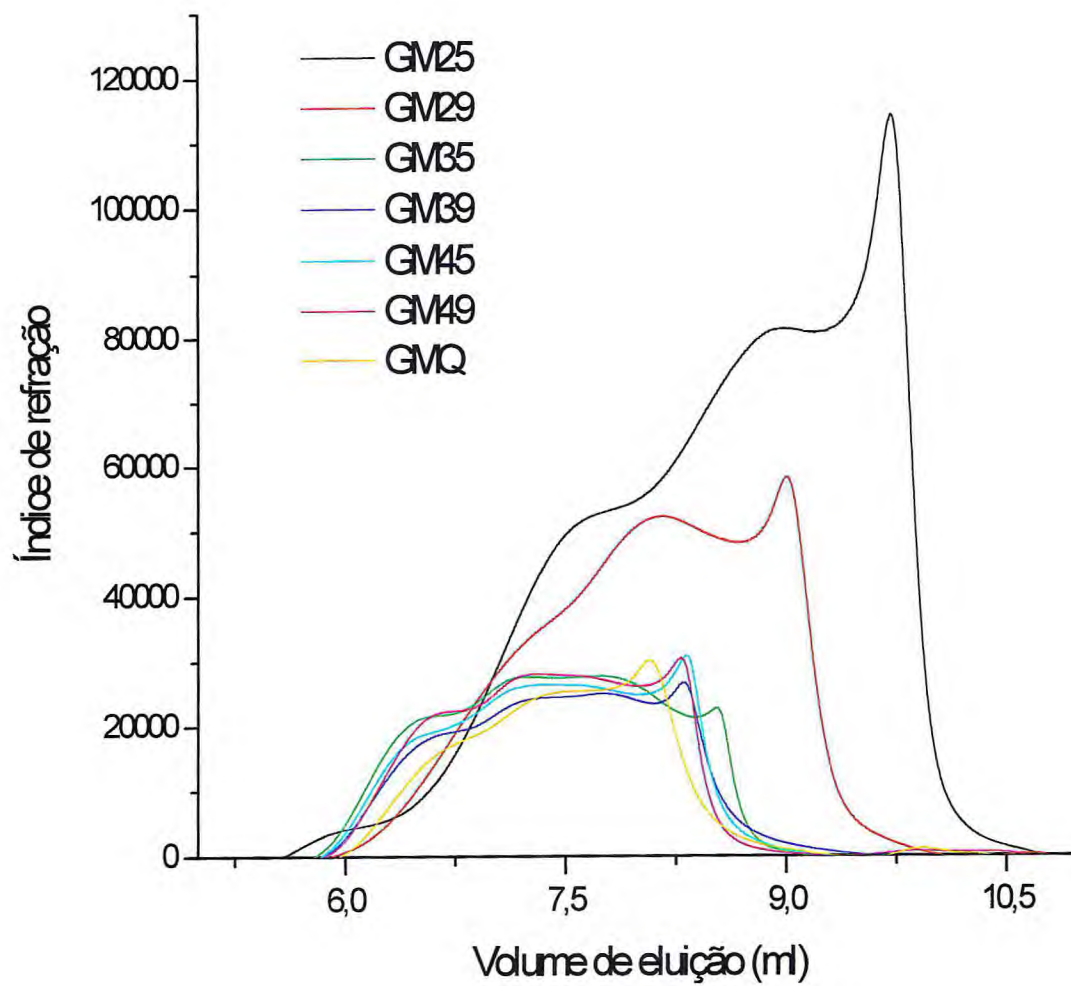


FIGURA 30- Cromatografia de permeação em gel (GPC) das galactomananas obtidas do endosperma do 25°, 29°, 35°, 39°, 45° e do 49° DAF e semente quiescente (Q).

TABELA 13- Mw (g/mol), Mn (g/mol) e Mw/Mn das galactomananas obtidas do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

DAF	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	Mw/Mn
25	$6,2 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	1,14
29	$2,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	1,08
35	$1,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	1,02
39	$2,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	1,04
45	$2,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	1,05
49	$2,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	1,03
Q	$2,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	1,04

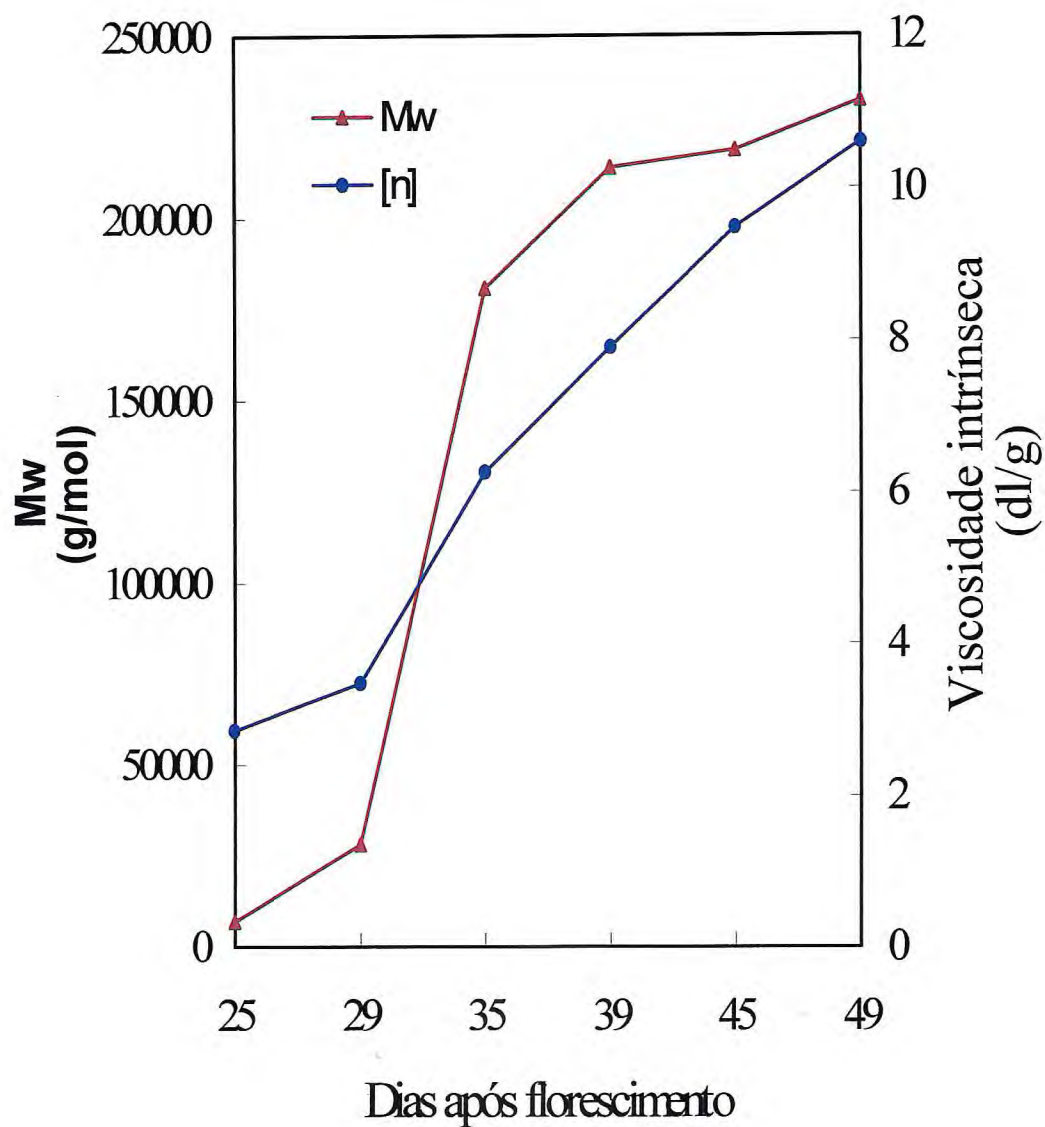


FIGURA 31- Mw (g/mol) e viscosidade intrínseca $[\eta]$ das galactomananas obtidas do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

A galactomanana da semente quiescente de *Caesalpinia pulcherrima* apresenta uma massa molar de $2,2 \times 10^5$ g/mol, um pouco inferior ao encontrado para a galactomanana de *Cassia grandis* (Caesalpiniaceae) que é de $8,02 \times 10^5$ g/mol (JOSHI & KAPOOR, 2003). A galactomanana de *Trigonella foenum-graecum* (Papilionaceae), *Cyamopsis tetragonoloba* (Papilionaceae) e de *Ceratonia siliqua* (Caesalpiniaceae) apresentam uma massa molar bem superior, ou seja, $1,4 \times 10^6$ g/mol, $1,3 \times 10^6$ g/mol e $1,2 \times 10^6$ g/mol, respectivamente (BRUMMER *et al.*, 2003). No entanto, foi encontrado um valor de massa molar entre $2,0 - 3,0 \times 10^5$ g/mol para a galactomanana de *C. tetragonoloba* (ELFAK *et al.*, 1977), bem próximo ao encontrado para a galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*.

Com relação ao índice de polidispersidade observa-se uma diminuição gradual à medida que o desenvolvimento da semente progride, ou seja, no 25° DAF este índice é de 1,14, enquanto que no 49° DAF esse índice cai para 1,03. Isso mostra que provavelmente no início do processo está ocorrendo uma síntese acelerada da galactomanana, ocasionando a síntese de várias cadeias polissacarídicas de diversos tamanhos, contribuindo assim, para uma polidispersidade alta. À medida que o desenvolvimento da semente entra na fase de maturação, todas as cadeias polissacarídicas apresentaram aproximadamente a mesma massa molar (M_n e M_w), o que evidentemente diminui a polidispersidade apresentada no início do processo.

Uma polidispersidade próxima de 1,0 indica uma amostra homogênea, ou seja, todas as cadeias polissacarídicas apresentam uma mesma massa molar. Dessa forma, a galactomanana do 49° DAF, cuja polidispersidade é de 1,03, é mais homogênea do que a galactomanana de *Cassia grandis* com polidispersidade de 1,35 (JOSHI & KAPOOR, 2003).

5.4.3- Determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$

A viscosidade intrínseca foi determinada a partir de uma solução em regime diluído considerando a concentração nula, isto é, sem interferência de outras cadeias e ou do solvente. Soluções de galactomananas do 25°, 29°, 35°, 39°, 45° e 49° DAF apresentaram viscosidade intrínseca crescente e contínua (Tabela 14 e Figura 31 e 32).

No 25° DAF a galactomanana apresenta uma $[\eta]$ de 2,86 dl/g e no 49° DAF observa-se um aumento para 10,59 dl/g. A galactomanana obtida da semente quiescente apresentou um discreto aumento na viscosidade intrínseca $[\eta]$ para 10,83 dl/g. Esse valor está próximo do encontrado para a goma de guar (10,5 dl/g) e fenogrego (9,61 dl/g) (BRUMMER *et al.*, 2003).

Para a galactomanana de sementes quiescentes de *C. pulcherrima* e *Cassia javanica* a viscosidade intrínseca detectada foi de 13,5 dl/g e 12,9 dl/g, respectivamente (ANDRADE *et al.*,1999).

Durante a deposição da galactomanana de *C. pulcherrima* (25°- 49° DAF) observa-se um aumento contínuo na massa molar e na viscosidade intrínseca das galactomananas obtidas ao longo do processo (Figura 31). Três fatores estariam contribuindo para o aumento da viscosidade intrínseca: (1)- o crescimento da cadeia polissacarídica; (2)- o aumento das interações intermoleculares entre as cadeias, conforme evidenciado pelo aumento na constante de Huggins; e (3)- o aumento na proporção M/G .

O coeficiente de Huggins é uma medida da interação polímero-polímero em solução. Este pode ser determinado experimentalmente a partir do gráfico de viscosidade intrínseca, sendo independente do M_w para longas cadeias. Observa-se na Tabela 14 que os valores determinados para o coeficiente de Huggins (K_H) aumentaram progressivamente de 0,44 no 25° DAF, para 1,36 na semente quiescente. O aumento do coeficiente de Huggins acompanhou a curva de viscosidade intrínseca, ou seja, a medida que a galactomanana aumenta em extensão, as associações intermoleculares aumentam, provavelmente devido a uma maior interação entre as cadeias de galactomananas (Tabela 14 e Figuras 31 e 33).

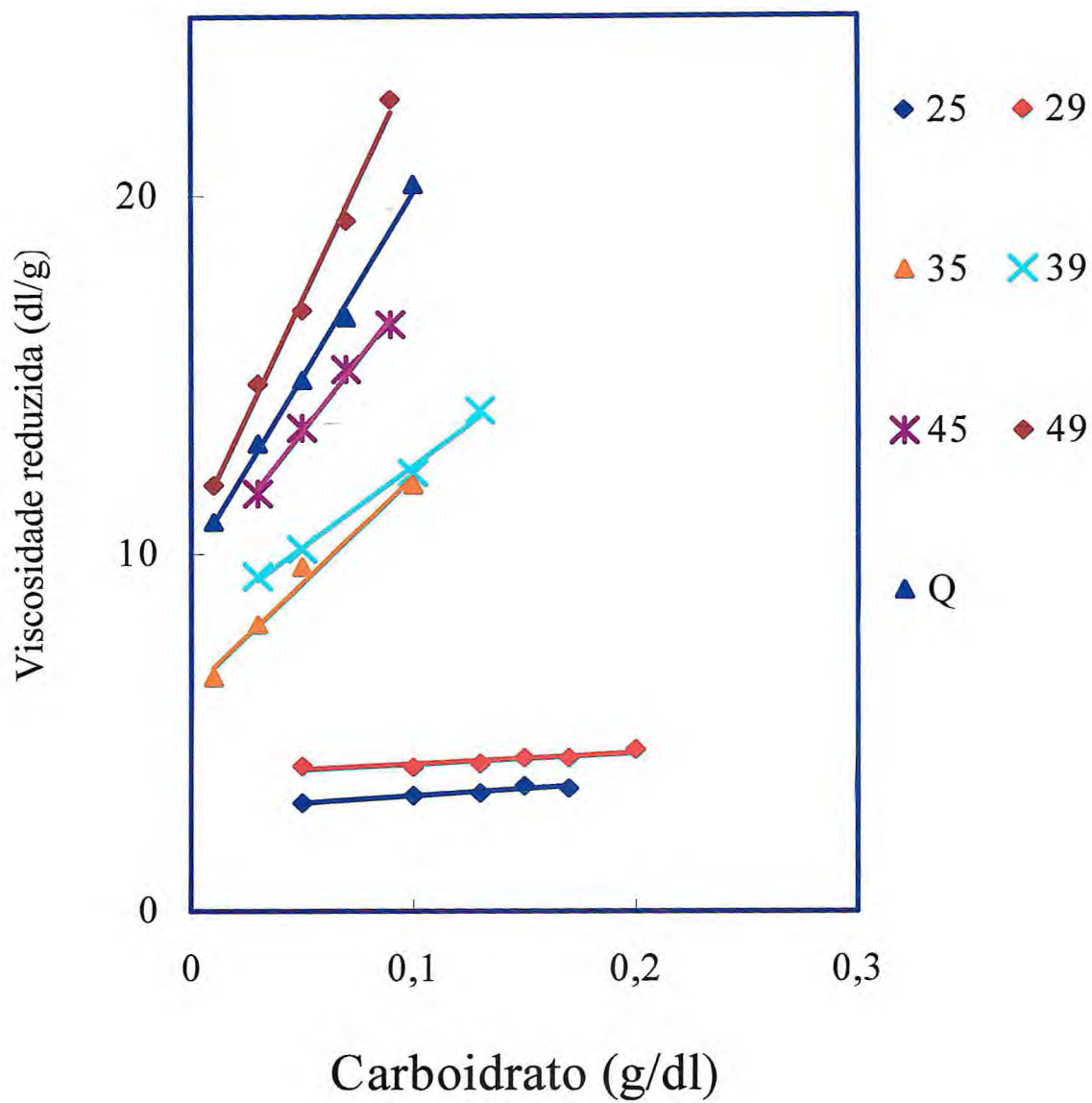


FIGURA 32- Determinação da viscosidade intrínseca das galactomananas obtidas do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

5.4.4- Cromatografia líquido-gasosa (GLC)

Quando galactomananas purificadas do endosperma da semente de *C. pulcherrima* foram hidrolisadas e avaliadas por cromatografia líquido-gasosa, observou-se a presença de unidades manose e galactose. Foram também detectadas variações no conteúdo desses açúcares durante o desenvolvimento do endosperma (Tabela 14). Entre o 25° e 35° DAF a proporção manose/galactose é de 3:1 e quando o processo de maturação está em sua fase final (45°- 51° DAF) essa proporção aumenta para 4,0:1. Observou-se, durante a deposição da galactomanana, uma relação diferenciada entre os seus monossacarídeos constituintes, provavelmente em decorrência da remoção das unidades galactosil, pela enzima α -galactosidase. Na semente quiescente de *C. pulcherrima* observou-se uma proporção M/G de 3,7:1, enquanto outros autores apontaram uma proporção de 2,83 (ANDRADE *et al.*, 1999) e 3:1 (UNRAU & CHOY, 1970).

Edwards *et al.* (1992), realizaram um estudo comparativo usando sementes em desenvolvimento de fenogregó (M/G=1,1), guar (M/G=1,6) e *Senna occidentalis* (M/G=3,3). Nesse estudo eles encontraram que as enzimas manosil- e galactosiltransferase apresentaram um pico correspondente a quantidade de galactomanana depositada. Com relação a proporção M/G, para fenogregó e guar esta permaneceu constante durante todo o período de desenvolvimento da semente, enquanto que em *S. occidentalis* a proporção M/G aumentou de 2,3 para 3,3. O aumento na proporção M/G está associada com um aumento concomitante na atividade da α -galactosidase presente no endosperma, sugerindo que estes dois fenômenos possam estar relacionados. Com base nesses resultados, os autores concluíram que em fenogregó e guar, o controle genético da proporção M/G na galactomanana parece estar baseado apenas no processo biossintético, enquanto que em *S. occidentalis* a galactomanana formada é provavelmente controlada pelo processo biossintético no início da maturação e posteriormente pela desramificação, onde as unidades galactosil são removidas pela ação da α -galactosidase, cuja atividade está elevada durante a deposição tardia da galactomanana.

Durante o desenvolvimento da semente de *Gleditsia triacanthos* (Caesalpiniaceae) foi observado um discreto aumento na proporção M/G, de 2,1 para 2,9, no início da deposição até a maturidade da semente. Essa alteração pode estar relacionada também à presença, mesmo em baixas concentrações, da enzima α -galactosidase na semente madura (MALLET *et al.*, 1987).

Os fatores que controlam o grau de substituição por galactose nas galactomananas, ao final da deposição, têm sido relacionado às concentrações relativas dos precursores UDP-galactose e GDP-manose (EDWARDS *et al.*, 1989), as propriedades intrínsecas e especificidades das enzimas do processo biossintético da galactomanana (EDWARDS *et al.*, 1999) e/ou pela remoção pós-deposição das unidades galactose pela α -galactosidase (EDWARDS *et al.*, 1992).

TABELA 14- Parâmetros físico-químicos das galactomananas obtidas do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

DAF	Man/Gal	Extrapolação de Huggins [η]	Coefficiente de Huggins (K_H)
25	3:1	2,86	0,44
29	3,1:1	3,48	0,42
35	3:1	6,26	0,55
39	3,4:1	7,91	0,73
45	4,0:1	9,47	0,88
49	3,8:1	10,59	1,16
Q	3,7:1	10,83	1,36

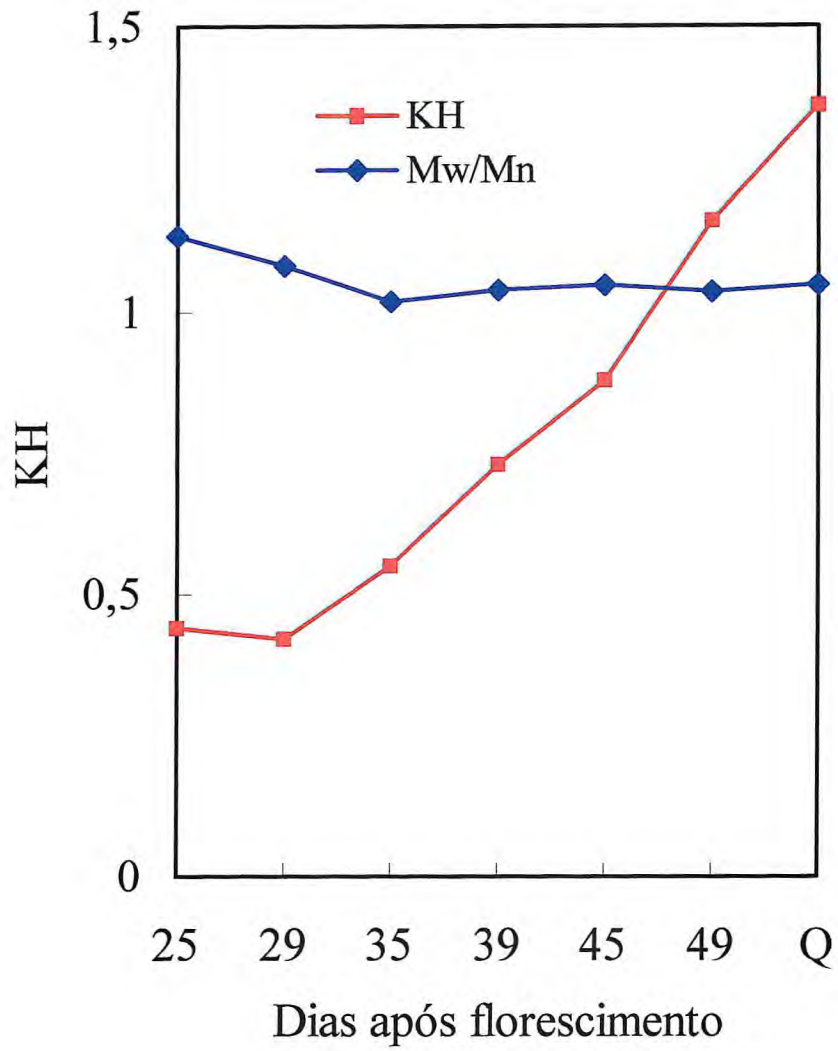


FIGURA 33- Constante de Huggins (K_H) e índice de polidispersidade ($IP = M_w/M_n$) das galactomananas obtidas do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

5.4.5- Espectro no infravermelho (IR)

Os espectros obtidos para as galactomananas (GM_1), obtidas dos endospermas do 25°, 35°, 39° DAF e semente madura (Q) de *C. pulcherrima*, são apresentados na Figura 34 A, B e C. O espectro no infravermelho (IR) das galactomananas não apresentaram diferenças significativas no padrão de bandas. Os gráficos mostram picos largos entre 3650cm^{-1} e 3000cm^{-1} do grupo hidroxil. E um pico em cerca de 2920cm^{-1} de C-H. Observou-se também muitos picos entre 900 e 1350cm^{-1} referentes a ligações simples C-O, C-C-H, C-O-H. Esse padrão é característico de polímeros e observa-se uma similaridade dos grupos funcionais envolvidos nas estruturas durante o processo de deposição da galactomanana (AZERO, 1999; MESTECHKINA *et al.*, 2001).

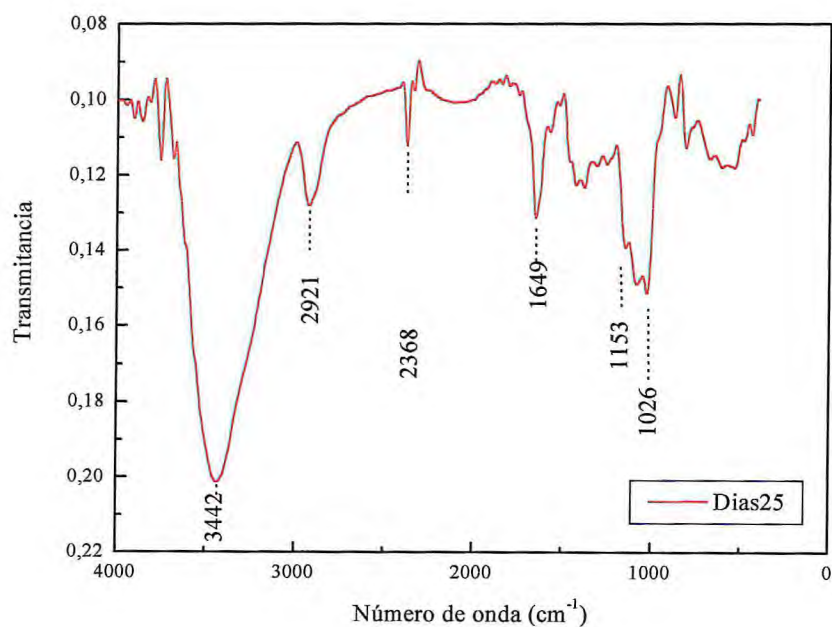


FIGURA 34 (A)– Espectro de absorção na região do infravermelho da galactomanana (GM_1) do endosperma da semente de *C. pulcherrima* do 25° DAF.

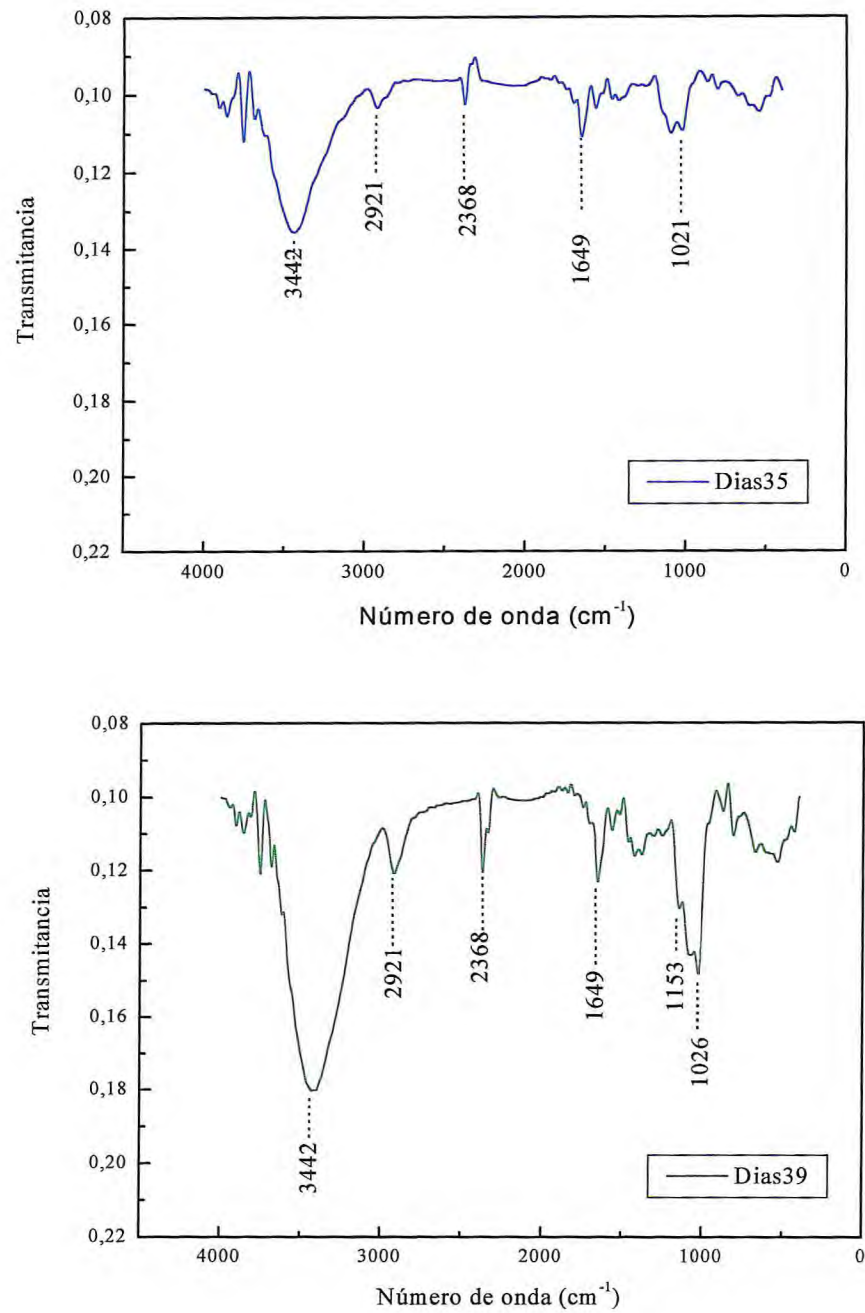


FIGURA 34 (B)– Espectro de absorção na região do infravermelho da galactomanana (GM₁) do endosperma da semente de *C. pulcherrima* do 35° e 39° DAF.

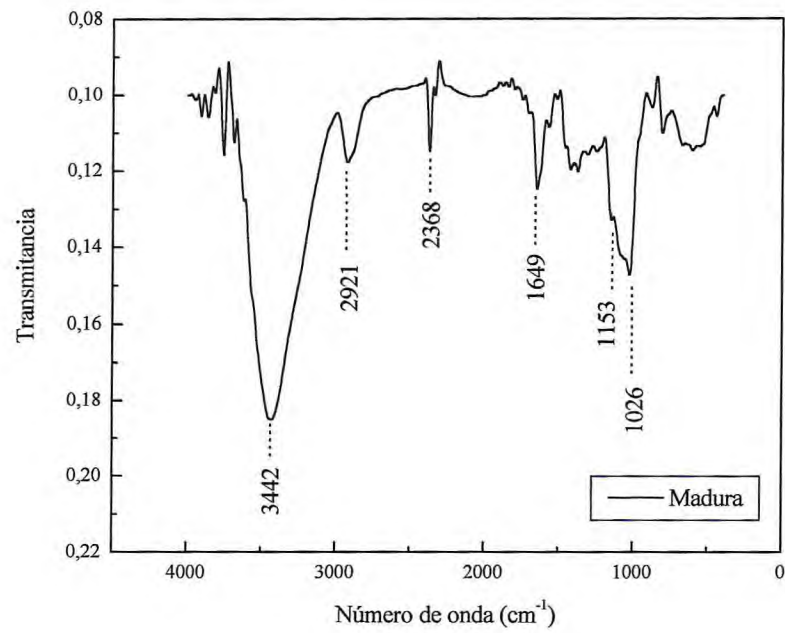
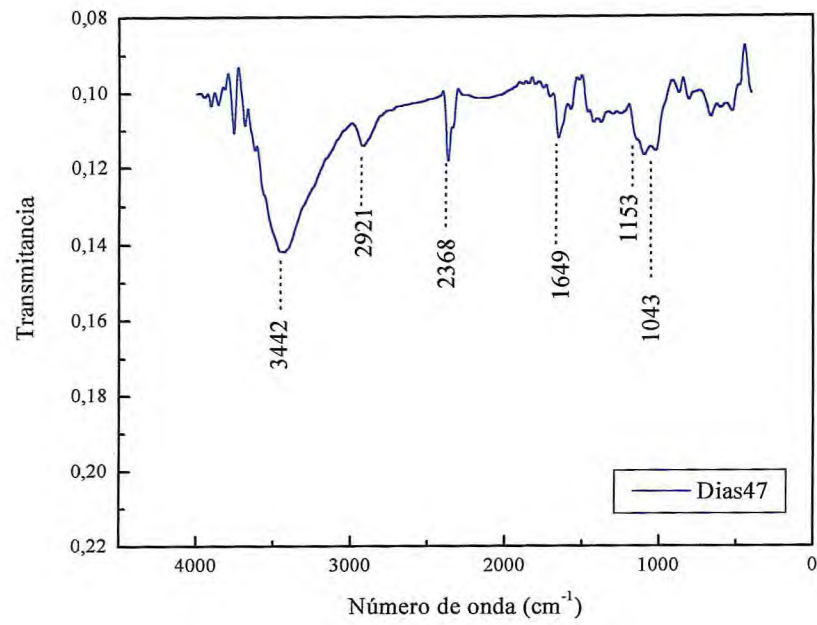


FIGURA 34 (C)–Espectro de absorção na região do infravermelho da galactomanana (GM_1) obtida do endosperma do 47° DAF e da semente madura de *C. pulcherrima*.

5.4.6- Determinação da atividade α -galactosidásica em extrato enzimático do endosperma da semente de *Caesalpinia pulcherrima* em desenvolvimento.

Foram preparados extratos enzimáticos do endosperma do 25°, 29°, 35°, 39°, 45°, 49° DAF e na semente quiescente (Q) com a finalidade de acompanhar a atividade da enzima α -galactosidase durante o desenvolvimento da semente de *C. pulcherrima*.

A atividade α -galactosidásica encontrada em extrato de endosperma do 25° DAF foi de 94 UA/órgão, seguido de um aumento gradual da atividade enzimática nos endospermas do 29°, 35° e 39° DAF, com valores de 211, 185 e 252 UA/órgão, respectivamente. A partir do 39° DAF observou-se um aumento brusco na atividade α -galactosidásica com um valor máximo de 1675 UA/órgão no 49° DAF. No entanto, essa alta atividade enzimática observada ao final do desenvolvimento da semente de *C. pulcherrima* (49° DAF) decresce na semente quiescente (Q) para um valor de 823 UA/órgão.

Quando se compara a atividade α -galactosidásica com a proporção manose/galactose da cadeia de galactomanana (Tabela 15 e Figura 35) observou-se que as duas curvas apresentaram um comportamento semelhante. Entre o 25° e 35° DAF, a proporção Man/Gal permaneceu praticamente constante (3:1) e, a partir do 45° até o 49° DAF houve um aumento tanto da proporção M/G (4,2:1 e 3,8:1, respectivamente) quanto da atividade α -galactosidásica (1675 UA/órgão).

A atividade α -galactosidásica presente em extrato enzimático de endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento evidencia a participação da enzima no processamento da galactomanana. O aumento da atividade α -galactosidásica nos extratos enzimáticos a partir do 39° DAF coincide com o aumento na proporção M/G, a medida que a deposição da galactomanana progride, sugerindo então que a enzima em atividade máxima (1675 UA/órgão) nos estágios finais do processo de maturação (39°- 49° DAF) é capaz de retirar unidades galactosil da cadeia de manana.

O aumento das interações, evidenciado pelo aumento crescente no coeficiente de Huggins (Tabela 14), pode estar sendo facilitada pela retirada das unidades galactosil, pela α -galactosidase, na cadeia de manana, aumentando assim o número de regiões não substituídas, facilitando assim uma maior interação entre as cadeias polissacarídicas.

TABELA 15- Proteína solúvel e atividade α -galactosidásica do extrato do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

DAF	Proteína			Atividade α -galactosidásica		
	mg/ml	mg/g farinha	mg/órgão	UA/g farinha	UA/mg proteína	UA/órgão
	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)
25	0,57 \pm 0,05	81,25 \pm 7,05	0,34 \pm 0,03	23.549 \pm 829	289 \pm 10,02	94 \pm 3,00
29	0,21 \pm 0,04	33,83 \pm 12,32	0,39 \pm 0,01	23.504 \pm 761	695 \pm 22,52	211 \pm 7,02
35	0,08 \pm 0,02	15,78 \pm 5,28	0,26 \pm 0,01	9.240 \pm 853	585 \pm 54,08	185 \pm 17,01
39	0,08 \pm 0,02	11,60 \pm 2,63	0,33 \pm 0,02	7.626 \pm 703	657 \pm 60,60	252 \pm 23,16
45	0,062 \pm 0,02	10,11 \pm 1,43	0,44 \pm 0,01	15.569 \pm 818	1.540 \pm 80,85	623 \pm 33,00
49	0,06 \pm 0,03	12,09 \pm 1,73	0,74 \pm 0,02	29.389 \pm 1034	2.431 \pm 85,64	1675 \pm 59,10
Q	0,07 \pm 0,01	12,03 \pm 0,00	0,64 \pm 0,01	15.525 \pm 980	1.291 \pm 81,79	823 \pm 51,65

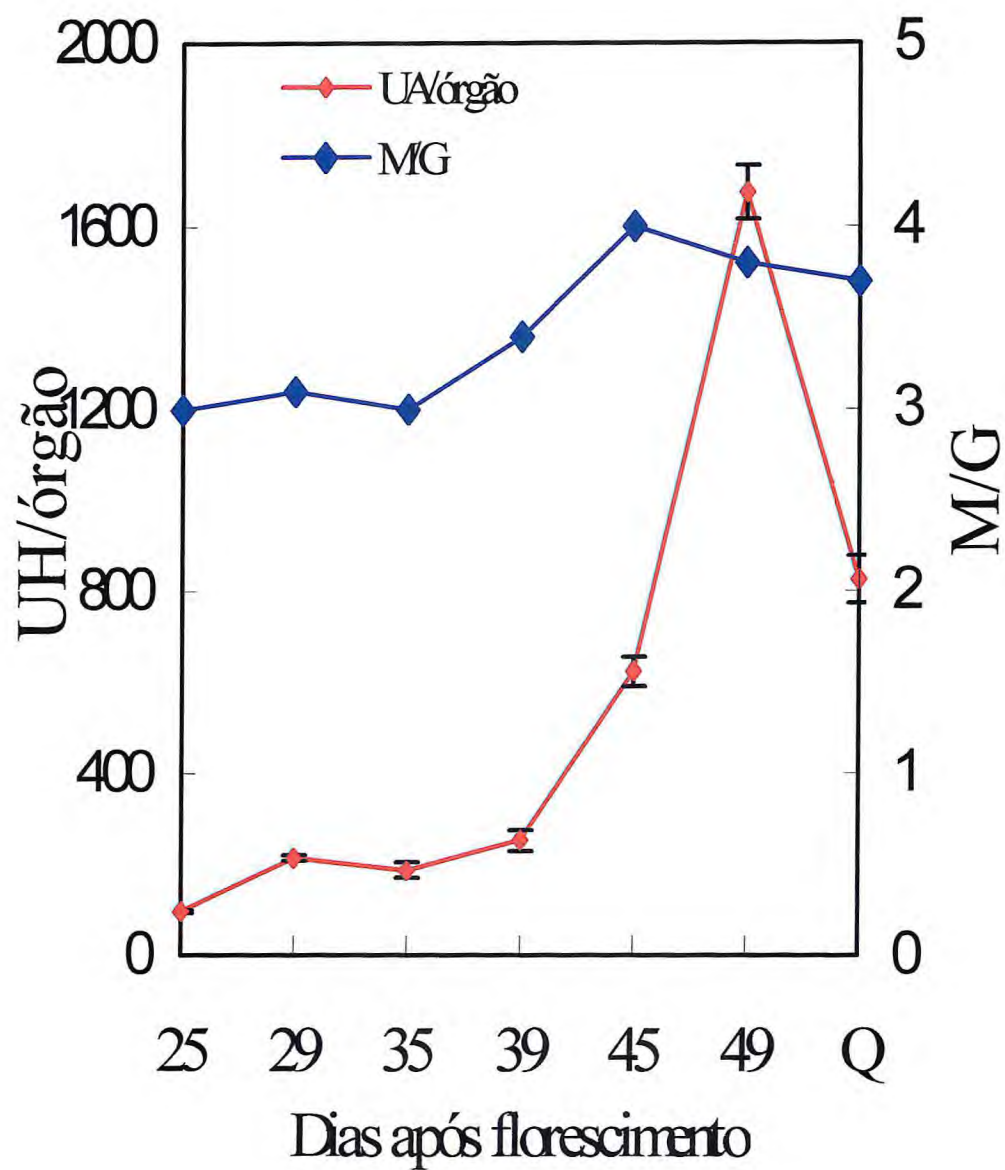


FIGURA 35- Curva de atividade α -galactosidásica do extrato enzimático obtido do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento (UA/órgão) e proporção Man/Gal das galactomananas.

5.4.7- Cromatografia de afinidade em coluna de goma de *Caesalpinia pulcherrima* em diferentes dias de maturação para o isolamento de lectinas galactose-ligante.

Seguindo o procedimento descrito por APUKUTTAN (1977), galactomananas do 25°, 29°, 35°, 39°, 45° e 49° DAF e Q, foram submetidas à reticulação com epícloridrina com o objetivo de obter géis estáveis em presença de água que foram utilizados como matrizes cromatográficas.

Com a finalidade de se estudar a capacidade de interação das diferentes gomas com lectinas galactose-ligante foram montadas diversas colunas possuindo a mesma massa (0,4g do gel reticulado e liofilizado), resultando em géis com um volume de 5 ml. Então, foram realizadas várias cromatografias de afinidade utilizando-se amostras ricas em lectinas de *Artocarpus incisa* (frutalina) e *Artocarpus integrifolia* (jacalina). Foram aplicados 2 ml do extrato total sendo eluído o primeiro pico com NaCl 0,15 M, que apresentou atividade hemaglutinante residual e um segundo pico retido, contendo a fração lectínica, eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 c/NaCl 0,15 M.

Os perfis cromatográficos das colunas contra extrato total de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia* estão mostrados nas Figuras 36 e 37. Constatou-se que as matrizes cromatográficas apresentaram capacidade de retenção da fração lectínica de maneira diferenciada. Foi feita também a avaliação da capacidade da coluna, com relação a quantidade de lectina retida (mg/ml) a partir da relação $A = \epsilon \cdot c \cdot \ell$ e do valor de ϵ para a frutalina ($\epsilon = 10,73$) e jacalina ($\epsilon = 15,8$).

A capacidade de retenção das diferentes matrizes cromatográficas, para as lectinas frutalina e jacalina estão mostradas na Tabela 16 e Figura 38. Pode-se observar que as matrizes apresentaram uma diminuição na capacidade de retenção das lectinas à medida que as gomas atingem estágios de desenvolvimento mais avançados (39°-45° DAF) e uma posterior recuperação nas matrizes de sementes quiescentes (Q).

Observou-se que todas as matrizes cromatográficas apresentaram uma capacidade de ligação maior à jacalina do que à frutalina. A matriz do 49° DAF reteve 13,68 mg de jacalina/g de gel, enquanto que a mesma coluna foi capaz de reter apenas 0,366 mg de frutalina/g de gel. Essa diferença corresponde a 3,7 vezes a capacidade de ligação à frutalina.

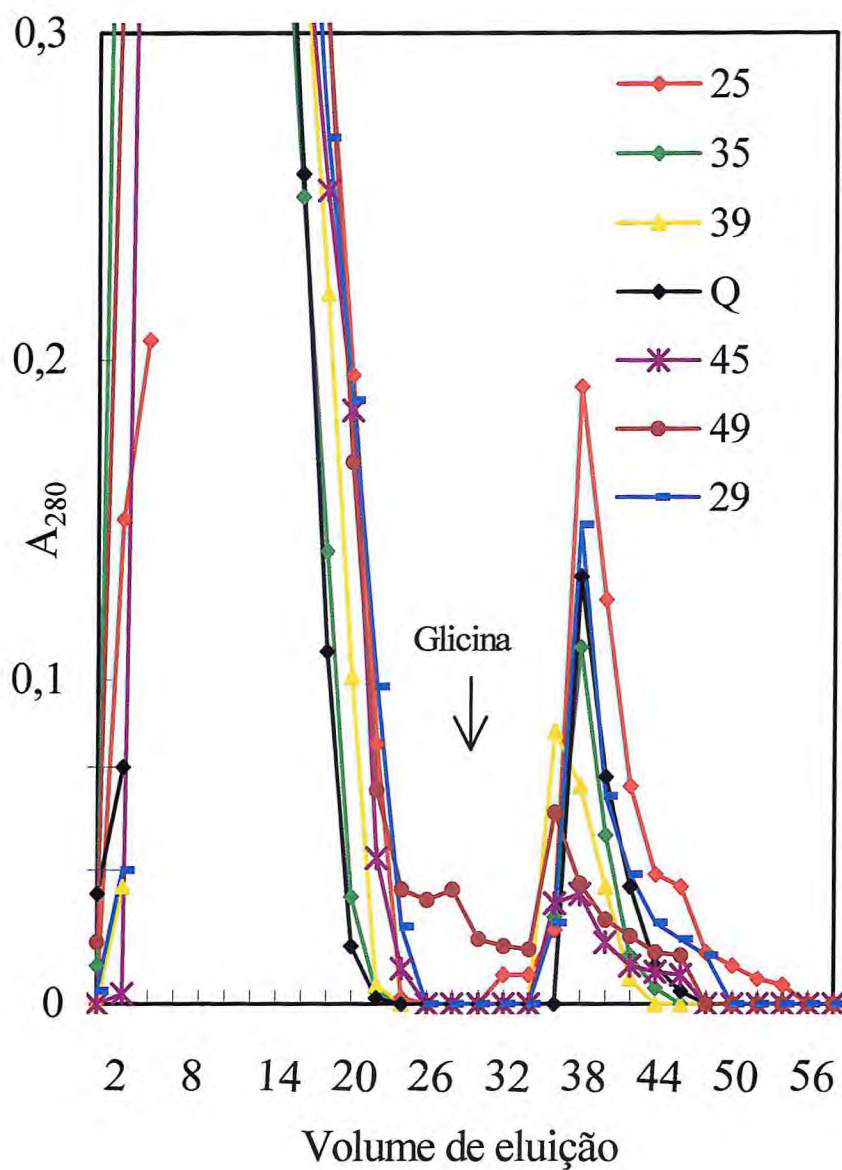


FIGURA 36-Cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana de *C. pulcherrima* (25°, 29°, 35°, 39°, 45°, 49° DAF e Q) contra extrato total de *Artocarpus incisa*. Amostras: 2 ml do extrato total; Fluxo: 20 ml/h; Fração: 2 ml/tubo.

Embora essas colunas tenham apresentado diferenças com relação a eficiência no isolamento dessas lectinas, notamos uma diferença na afinidade das diferentes matrizes para frutalina e jacalina. As matrizes obtidas de endospermas mais jovens (25°-35° DAF) apresentaram uma capacidade maior de retenção, enquanto que as matrizes dos endospermas mais desenvolvidos (39° e 45° DAF), mostraram uma capacidade bastante reduzida de ligação a essas lectinas. No entanto, a partir do 45° DAF notou-se uma recuperação dessa capacidade, alcançando valores próximos a apresentada pela matriz do 25° DAF, para a frutalina e jacalina.

As matrizes cromatográficas do 25°, 29° e 35° DAF, apresentaram praticamente a mesma capacidade de ligação a frutalina, ficando os valores entre 0,73-0,76 mg de frutalina/grama de gel (Figura 38). Após o 35° dia, observou-se uma diminuição na capacidade de retenção com uma posterior recuperação na matriz de semente quiescente. Essa recuperação corresponde a 85% da capacidade da coluna de 25 dias.

Pode-se observar na Tabela 16 que nas matrizes do 25°, 29° e 35° DAF a quantidade de jacalina retida foi praticamente constante. A matriz do 45° DAF apresentou a menor capacidade de retenção e a matriz do 49° DAF e semente quiescente apresentaram uma recuperação da capacidade de ligação à jacalina.

Pode-se atribuir a recuperação na capacidade de ligação à lectina, a uma possível alteração estrutural nas galactomananas durante sua deposição. Essa alteração facilitaria o acesso das lectinas (frutalina e jacalina) ao polissacarídeo através do seu sítio de ligação à carboidrato.

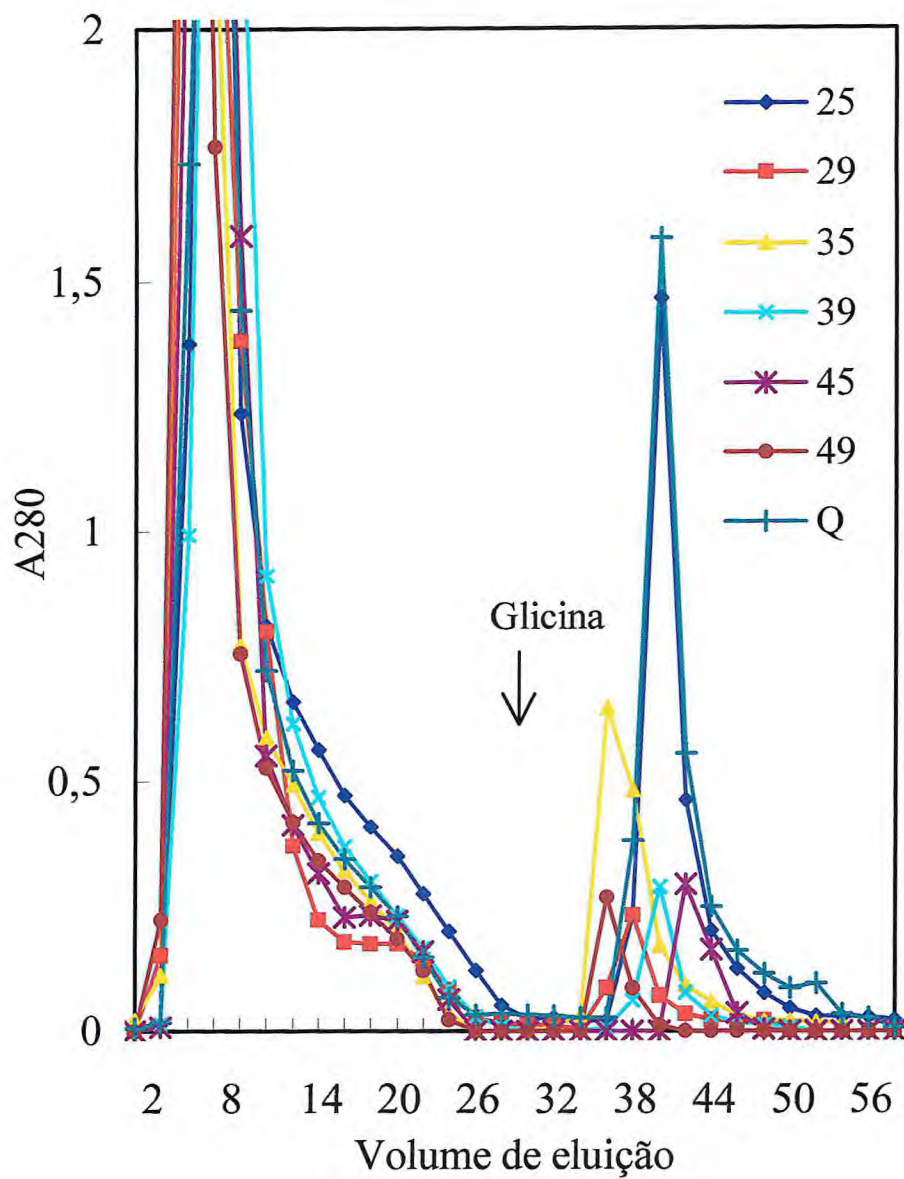
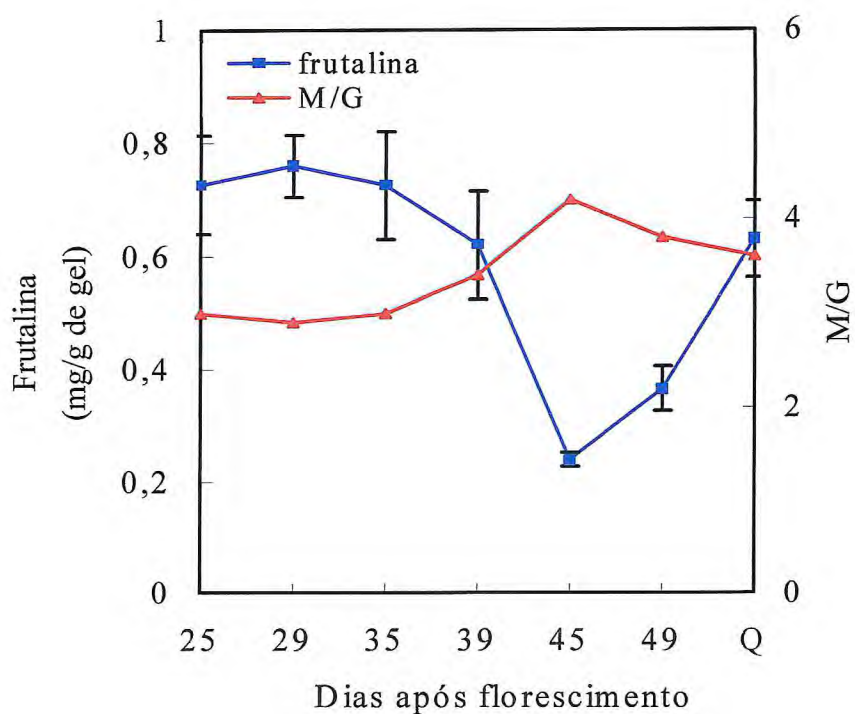


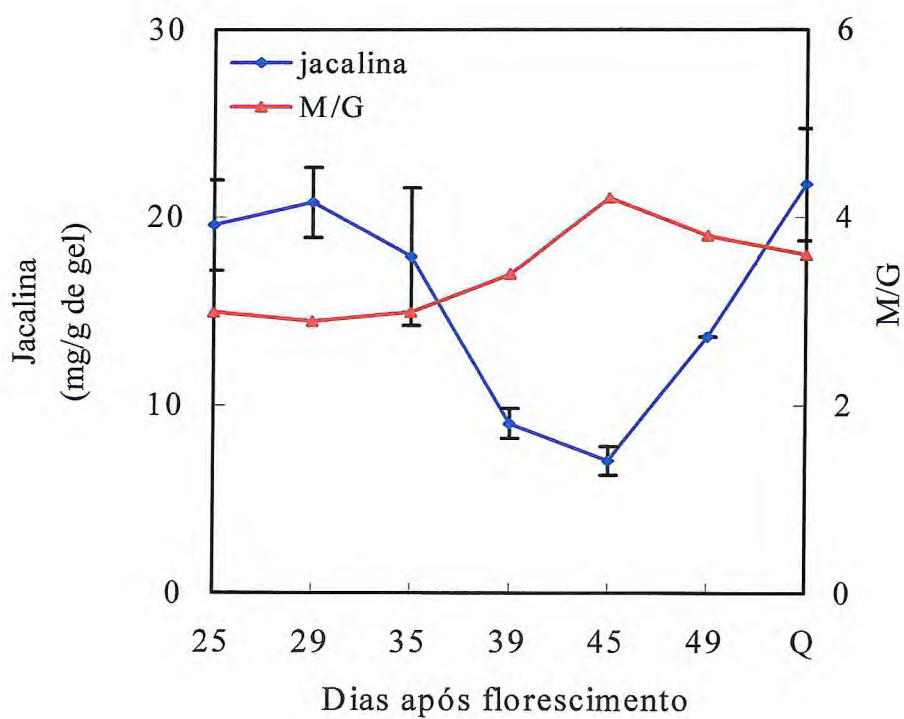
FIGURA 37- Cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana de *C. pulcherrima* (25°, 29°, 35°, 39°, 45°, 49° DAF e Q) contra extrato total de *Artocarpus integrifolia*. Amostras: 2 ml do extrato total; Fluxo: 20 ml/h; Fração: 2 ml/tubo.

TABELA 16- Capacidade de retenção das lectinas (mg de lectina/g de gel) de *Artocarpus incisa* (frutalina) e *Artocarpus integrifolia* (jacalina) por cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana reticulada obtida do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento.

DAF	Frutalina ($X \pm \sigma$)	Jacalina ($X \pm \sigma$)
25	0,726 \pm 0,087	19,554 \pm 2,399
29	0,760 \pm 0,055	20,753 \pm 1,875
35	0,725 \pm 0,096	17,901 \pm 3,635
39	0,620 \pm 0,095	9,042 \pm 0,779
45	0,240 \pm 0,012	7,050 \pm 0,786
49	0,366 \pm 0,040	13,680 \pm 0,001
Q	0,630 \pm 0,067	21,733 \pm 2,973



A



B

FIGURA 38- Capacidade de retenção da frutalina (A) e jacalina (B), em diferentes matrizes de galactomanana do endosperma da semente de *C. pulcherrima* em desenvolvimento e proporção M/G.

6.4.8- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol das frações protéicas obtidas nas cromatografias de afinidade.

A eletroforese obtida quando as lectinas de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia* foram purificadas através das colunas de goma de *Caesalpinia pulcherrima* tratadas com epicloridrina são mostradas nas Figuras 39 e 40.

Pode-se observar que todos os picos não retidos (PI) nas cromatografias de afinidade contra extrato total de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia* apresentaram bandas correspondentes as suas lectinas, evidenciando uma saturação da coluna. Nas frações retidas (PII) de *Artocarpus incisa* observou-se a presença de duas bandas protéicas com 15,5 kDa e 12 kDa características da frutalina (MOREIRA *et al.*, 1998). As frações retidas (PII) na cromatografia de afinidade contra extrato total de *Artocarpus integrifolia* apresentaram duas bandas de 15 kDa e 18 kDa presentes na jacalina (HAGIWARA *et al.*, 1988).

Portanto, por SDS-PAGE, pode-se comprovar a capacidade das matrizes cromatográficas, obtidas por modificação química da goma de *C. pulcherrima* em diferentes estágios de maturação, em reter lectinas galactose-ligantes.

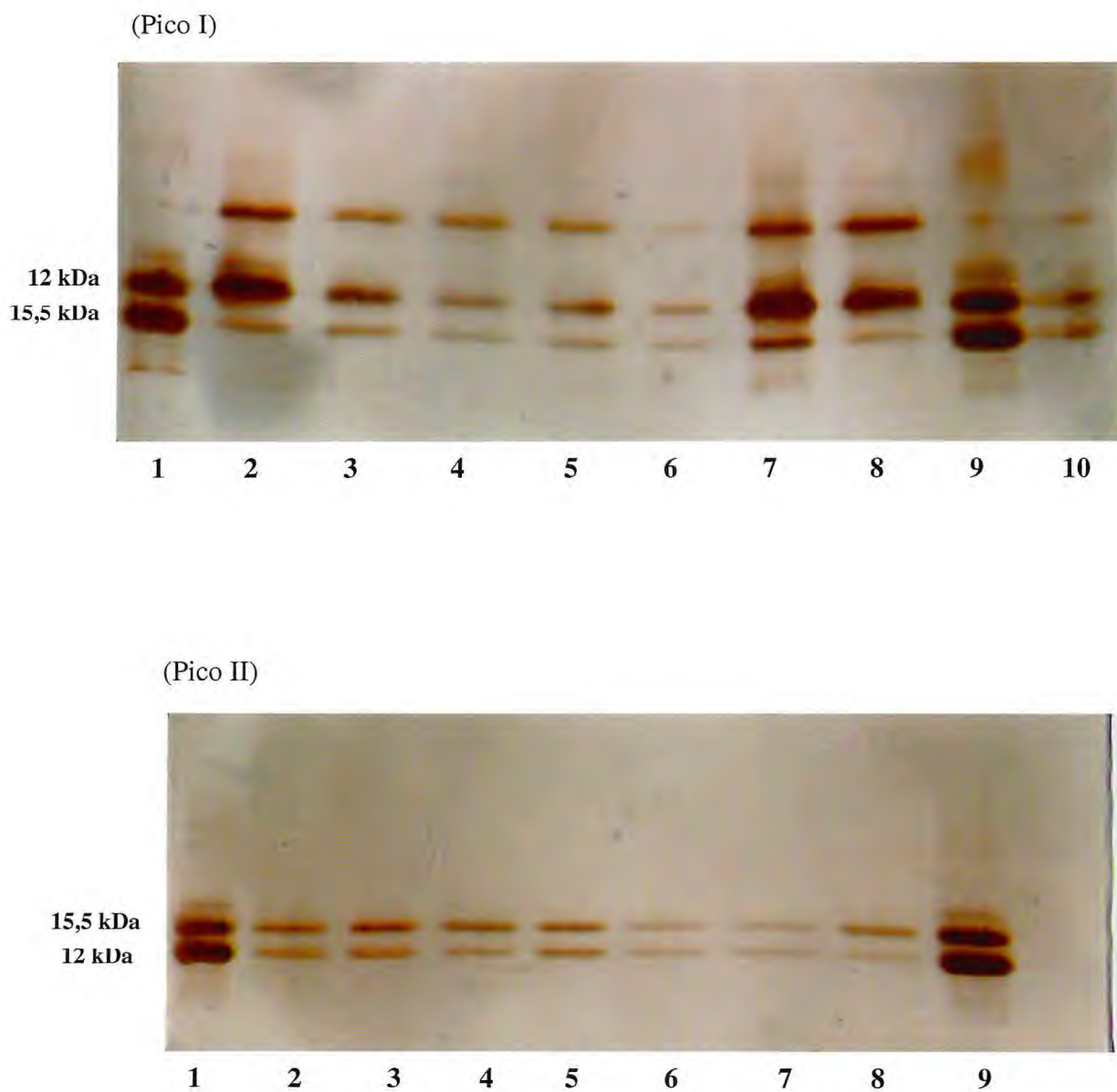
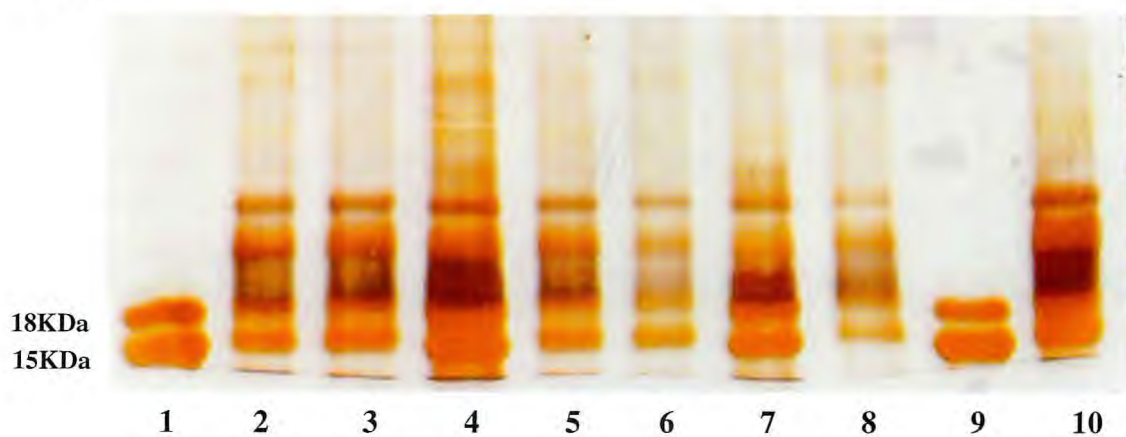


Figura 39-Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β - mercaptoetanol das frações não retidas (PI) e retidas (PII) de extrato total de *Artocarpus incisa*, obtida por cromatografia de afinidade em colunas de goma de sementes de *C. pulcherrima* em desenvolvimento. Amostras: PI: (1) e (9) Frutalina; (2) 25 dias, (3) 29 dias, (4) 35 dias, (5) 39 dias, (6) 45 dias, (7) 49 dias, (8) semente madura (Q) e (10) Extrato total; PII: (1) e (9) Frutalina, (2) 25 dias, (3) 29 dias, (4) 35 dias, (5) 39 dias, (6) 45 dias, (7) 49 dias e (8) semente madura (Q).

(Pico I)



(Pico II)

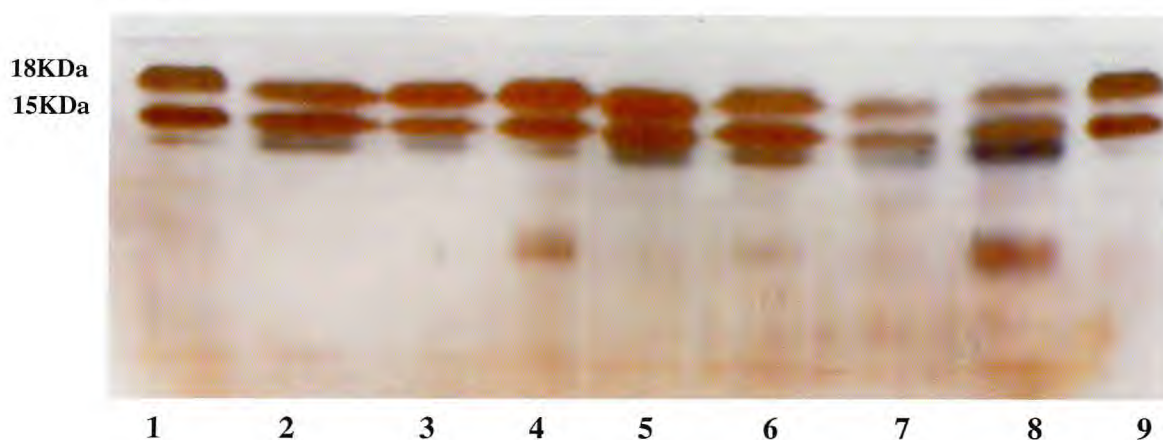


Figura 40-Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β - mercaptoetanol das frações não retidas (PI) e retidas (PII) de extrato total de *Artocarpus integrifolia*, obtida por cromatografia de afinidade em colunas de goma de sementes de *C. pulcherrima* em desenvolvimento. Amostras: PI: (1) e (9) Jacalina; (2) 25 dias, (3) 29 dias, (4) 35 dias, (5) 39 dias, (6) 45 dias, (7) 49 dias, (8) semente madura (Q) e (10) Extrato total; PII: (1) e (9) Jacalina, (2) 25 dias, (3) 29 dias, (4) 35 dias, (5) 39 dias, (6) 45 dias, (7) 49 dias e (8) semente madura (Q).

6. CONCLUSÕES

1. O desenvolvimento da semente de *Caesalpinia pulcherrima* segue o mesmo padrão observado para outras sementes de leguminosas.
2. O completo desenvolvimento da semente de *Caesalpinia pulcherrima* ocorreu entre o 45° e 49° DAF.
3. O endosperma apresenta um conteúdo em carboidrato de 96% com relação à massa seca do órgão.
4. A galactomanana é o principal polissacarídeo (PRPC) do endosperma da semente de *C. pulcherrima*, correspondendo a 81% do total de carboidrato no endosperma.
5. A biossíntese da galactomanana é um processo contínuo que ocorre durante todo o desenvolvimento da semente.
6. O índice de polidispersidade diminui ao longo da deposição da galactomanana, indicando uma homogeneidade entre os polímeros ao final do processo.
7. A viscosidade intrínseca $[\eta]$ e o coeficiente de Huggins (K_H) das galactomananas aumentam continuamente ao longo de todo o processo, evidenciando assim, o crescimento da cadeia polissacarídica e um aumento das interações polímero-polímero.
8. O espectro na região do infravermelho não revelou alterações significativas no padrão de bandas características para as galactomananas durante o desenvolvimento da semente.
9. O aumento na proporção M/G está relacionado com o aumento da atividade α -galactosidásica durante a deposição da galactomanana.
10. A síntese completa da galactomanana envolve um processo biossintético seguido de desramificação, liberando o produto com uma proporção M/G característico da semente madura.
11. A capacidade das matrizes cromatográficas em reter lectinas galactose-ligante pode estar relacionada com a proporção M/G e modificações na estrutura tridimensional da galactomanana que podem ocorrer durante o desenvolvimento da semente.
12. As frações retidas (PII) em todas as cromatografias de afinidade, apresentaram as mesmas bandas correspondentes às suas lectinas, confirmando assim, a capacidade das diferentes matrizes em reter lectinas galactose-ligante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J.; Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, v.96, p.23-25, 1965.

AL-KAISEY, M. T.; WILKIE, C. B. The polysaccharides of agricultural lupin seeds. **Carbohydrate Research**, v.227, p.147-161, 1992.

AMOR, Y. *et al.* A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.20, p. 9353-9357, 1995.

ANDRADE, C. T. *et al.* Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. **International Journal of Biological macromolecules**, v.26, p.181-185, 1999.

ANUMULA, K. R.; TAYLOR, P. B. A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.203, p.101-108, 1992.

APPUKUTTAN, P. S.; SUROLIA, A.; BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose binding protein from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v.14, p.382-384, 1977.

ASPINALL, G. O. Isolation and fractionation of polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. Academic Press., New York, v.1, p. 19-26, 1982.

ASPINALL, G. O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v.14, p.429-468, 1959.

AZERO, E. G. R. **Galactomananas de fontes não tradicionais e sua utilização em misturas**. Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 216p.,1999.

BARRAL-NETO, M. *et al.* Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological Investigations**, v.21, n.4, p.297-303, 1992.

BAUD, S. *et al.* An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology Biochemistry**, v.40, p.151-160, 2002.

BELTRATI, C.M., **Morfologia de semente – prática**. Apostila, Departamento de Botânica - UNESP, Rio Claro, 1995.

BERGER, F. Endosperm development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.28-32, 1999.

BERRIAUD, N.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Rheological study on mixtures of different molecular weight hyaluronates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.3, p.137-142, 1994.

BEUTH, J. Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastasis. **Glycoconjugate Journal**, v.12, p.1-7, 1995.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds. Physiology of Development and Germination**. Plenum Press. New York and London 2ª edição, 421p.,1994.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v.54, p.484-489, 1973.

BLUN, H.; BEIR, H.; GROSS, J. K. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA. **In gels eletrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BOESEWINKEL, F. D.; BOUMAN, F. **The seed: structure and function**. In: Kigel J., Galili G., eds. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, p.1-24, 1995.

BORISJUK L. *et al.* Embryogenesis of *Vicia faba* L.: histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. **Journal Plant Physiology**, v.147, p.203-218, 1995.

BORISJUK L. *et al.* Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p.503-512, 2003.

BORISJUK, L. *et al.* Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. **Plant Biology**, v.6, p.375-386, 2004.

BOURQUELOT, E.; HÉRISSEY, H. **Compt. Rend.**, v.129, n.228, p.391-395, 1899. Citado por Dea & Morrison, 1975.

BRAGA, R. C. **Goma endospérmica de *Caesalpinia pulcherrima*. Utilização como**

matriz de afinidade no isolamento de lectinas galactose-ligantes. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2001.

BRANT, D. A. Conformation and behavior of polysaccharides in solution. In: PRESS, J., ed. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, v.3, p.425-472, 1980.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Wall**, 2nd edn. Chapman and Hall, London, 1996.

BRETON, C.; IMBERTY, A. Structure/function studies of glycosyltransferases. **Current Opinion Structural Biology**, v.9, p.563-571, 1999.

BROWN, R. C. *et al.* Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*. **Sexual Plant Reproduction**, v.12, p.32-42, 1999.

BROWN, R. C.; LEMMON, B. E.; OLSEN, O. A. Polarization predicts the pattern of cellularisation in cereal endosperm. **Protoplasma**, v.192, p.168-77, 1996.

BRUMMER, Y.; CUI, W.; WANG, Q. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.229-236, 2003.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular of Plants**, American Society of Plant Physiologists-USA, 1367 p., 2000.

BUCKERIDGE, M. S. *et al.* Seed galactomannan as marker in the taxonomy and evolution of the Leguminosae. **Phytochemistry**, v.38, n.4, p.871-875, 1995.

BUCKERIDGE, M. S.; REID, J. S. G. Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo- β -(1 \rightarrow 4)-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. **Planta**, v.192, p.502-511, 1994.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. B.; TINÉ, M. A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.141-156, 2000.

BUCKERIDGE, M. S.; VERGARA, C. E.; CARPITA, N. C. The mechanism of synthesis of a mixed-linkage (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucan in maize. Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. **Plant Physiology**, v.120, p.1105-1116, 1999.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during

growth. **Plant Journal**, v.3, n.1, p.1-30, 1993.

CAVADA, B. S. *et al.* Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p.675-680, 1998.

CHANZY, H. *et al.* An electron diffraction study of mannan I. Crystal and molecular structure. **Macromolecules**, v.20, p.2407-2413, 1987.

CHAUDHURY, A. M. *et al.* Control of early seed development. **Annals Review Cell and Review Biology**, v.17, p.677-699, 2001.

CHRISPEELS, M. J.; BOLLINI, R. Characteristics of membrane-bound lectin in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons. **Plant Physiology**, v.70, p.1425-1428, 1982.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V., Lectins: lectins genes and their role on plant defense. **Plant Cell**, v.13, n.1, p.1-9, 1991.

CHURMS, S. C.; STEPHEN, A. M.; STEYN, C. B. Analytical comparison of gums from *Acacia hebeclada* and other gummiferae species. **Phytochemistry**, v.25, p.2807, 1986.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v.131, p.209-217, 1984.

CIUCANU, I.; LUCA, C. Avoidance of degradation during the methylation of uronic acids. **Carbohydrate Research**, v.206, p.71-77, 1990.

CORNER, E. J. H. The leguminous seed. **Phytomorphology**, v.1, p.117-150, 1951. Citado por Van Dongen *et al.*, 2003.

CORTELAZZO, A. L.; VIDAL, B. C. Soybean seed proteins: detection *in situ* and mobilization during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, v.14, p. 27-33, 1991.

CORTELAZZO, A. L.; VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. Basic fuchsin and the Schiff-aldehyde reaction. I. spectral absorption characteristics in solution. **Acta Histochemistry**, v.73, p.121-133, 1983.

COSGROVE, D. J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. **Annals Review Cell Development Biology**, v.13, p.171-201, 1997.

COSGROVE, D. J. Enzymes and others agents that enhance cell wall extensibility. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.86, p.391-417, 1999.

COSGROVE, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. **Plant Physiology**, v.125, p.131-134, 2001.

COURTOIS, J. E.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; PETEK, F. **Bulletin Society Chemistry Biology**, v.40, p.1277-1285, 1958.

DAHAL, P.; NEVINS, D. J.; BRADFORD, K. J. Relationship of Endo-[beta]-D-Mannanase Activity and Cell Wall Hydrolysis in Tomato Endosperm to Germination Rates. **Plant Physiology**, v.113, p.1243-1252, 1997.

DAOUD, K. M. **Biochemical Journal**, v.26, p.255-263, 1932. Citado por Dea & Morrison, 1975.

DAVIDSON, R. L. **Handbook of water-soluble gums and resins**, New York: McGraw Hill Book Co, 1980.

DEA, I. C. M. The role of structural modification in controlling polysaccharide functionality. In: YALPANI, M. **Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications**. Amsterdam: Elsevier Sciences, p. 207-216, 1987.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advanced Carbohydrate Chemical and Biochemistry**, v.31, p.241-312, 1975.

DEY, P. **Advanced Carbohydrate Chemical and Biochemistry**, v.37, p.283-372, 1980.

DEY, P.M.; PRIDHAM, J. B., Purification and properties of α -galactosidases from *Vicia faba* seeds. **Biochemical Journal**, v.113, p.49-55, 1969.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**, v.78, p. 312-319, 1961.

DWEK, R. A. Glycobiology: toward understanding the functions of sugars. **Chemistry Reviews**, Washington, v.96, p.683-720, 1996.

EDWARDS, M. E. *et al.* Molecular characterisation of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. **Plant Journal**, v.19, p.691-697, 1999.

EDWARDS, M. E. *et al.* Transfer specificity of detergent-solubilized fenugreek galactomannan galactosyltransferase. **Plant Physiology**, v.129, p.1391-1397, 2002.

EDWARDS, M. *et al.* Biosynthesis of legume-seed galactomannans in vitro. **Planta**, v.178, p.41-51, 1989.

EDWARDS, M. *et al.* Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. **Planta**, v.163, p.133-140, 1985.

EDWARDS, M. *et al.* Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. **Planta**, v.187, p.67-74, 1992.

EFFRONT, J. **Compt. Rend.**, v.125, p.38-40, 1897. Citado por Dea & Morrison, 1975.

ELFAK, A. M.; PASS, G.; PHILLIPS, G. O.; MORLEY, R. G. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.28, p.895, 1977. Citado em Gynther & Hubtikangas, 1984.

FELKER, F. C.; PETERSON, D. M.; NELSON, O.E. Anatomy of immature grains of eight maternal effect shrunken endosperm barley mutants. **American Journal of Botany**, v.72, p.248-56, 1985.

FLODIN, P. **Dextran gels and their applications in gel filtration**. Dissertation, 85 p., AB Pharmacia, Upssala, Sweden, 1962.

FRESHOUR, G. *et al.* Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.110, p.1413-1429, 1996.

FRY, S. C. Analysis of crosslinks in the growing cell-walls of higher plants. **In Modern Methods of Plant Analysis**, New Series. Linskens, H. F. and Jackson, J. F. (Eds.). Berlin:Springer, v.10, p.12-36, 1989.

FRY, S. C. *et al.* An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiologia Plantarum**, v.89, p.1-3, 1993. Citado por Buckeridge *et al.*, 2000.

FRY, S. C. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.497-520, 1995.

FUGITA, Y.; OISHI, K.; IMAHORI, K.; Purification and properties of an Anti-B Hemagglutinin produced by *Streptomyces* sp. **Biochemistry**, v.14, p.4465-4470, 1975.

GANTER, J. L. M. S. *et al.* Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.17, n.1, p.13-19, 1995.

GANTER, J. L. M. S. *et al.* Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydrate Polymer**, v.17, p.171-175, 1992.

GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Minosaceae* spp. **Bioresource Technology**, v.68, p.55-62, 1999.

GARROS-ROSA, I. **Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L. Caracterização estrutural e aplicação no isolamento de lectinas ligantes de galactose.** Tese de Doutorado, Fortaleza, Ceará, 2000.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, v.189, p.329-339, 1993.

GIBEAUT, D. M.; CARPITA, N. C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **FASEB Journal**, v.8, p.904-915, 1994.

GIDLEY, M. J. *et al.* Structure and solution properties of tamarind-seed polysaccharide. **Carbohydrate Research**, v.214, p.299-314, 1991.

GOLDBERG, R. B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis:zygote to seed. **Science**, v.266, p.605-614, 1994.

GOLDBERG, R. Etude des polysaccharides de reserve de deux graines de liliacées: *Asparagus officinalis* L. et *Endymion nutans*. **Phytochemistry**, v.8, p.1783-1792, 1969.

GOLDSTEIN, I. J. *et al.* What should be called a lectin ? **Nature**, v.285, p.66, 1980.

GUPTA, A. K. & BOSE, S. Structure of the D-galacto-D-mannan isolated from the seeds of *Melilotus indica* All. **Carbohydrate Research**, v.153, p.69-77, 1986.

GYNTHER, J.; HUBTIKANGAS, A. Review: Guar Gum, Chemistry and Applications. **Acta Pharmaceutica Fennice**, v.93, p.175-184, 1984.

HAGIWARA, K. *et al.* Jacalina: isolation, characterization, and influence of various factors on its interaction with human IgA1, as assessed by precipitation and latex agglutination. **Molecular Immunology**, v.25, p.69-83, 1988.

HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanium in dimethyl sulphoxide. **Journal of Biochemistry**, v.55, p.205-207, 1964.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.139, 1989.

HAYASHI, T.; MACLACHLAN, G. Pea xyloglucan and cellulose I macromolecular organization. **Plant Physiology**, v.75, p.596-604, 1984.

HAYASHI, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. **Plant Cell Physiology**, v.35, p.1199-1205, 1994.

HEGNAUER, H.; GRAYER-BARMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae; a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v.34, p.3-16, 1993.

HEINRICHER, E. Zur Biologie der gattung *Impatiens*. **Flora Jena**, v.71, 1888. Citado por Buckeridge *et al.*, 2000.

HILLER, A.; PLAZIN, J.; VAN-SLYKE, B. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.176, n.3, p.1401-1420, 1948.

HIRST, E. L.; JONES, J. K. N.; WALDER, W. O. Pectic substances Part 7: the constitution of the galactan from *Lupinus albus*. **Journal of Chemical Society**, p.1225-1229, 1947. Citado por Buckeridge *et al.*, 2000.

HIRST, E. L.; PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. **Methods of Carbohydrate Chemistry**, v.5, p.287-298, 1965.

HOPF, H.; KANDLER, O. Characterization of the "reserve cellulose" of the endosperm of *Carum carvi* as a $\beta(1\rightarrow4)$ -mannan. **Phytochemistry**, v.16, p.1715-1717, 1977.

HOSON, T. Physiological functions of plant cell coverings. **Journal of Plant Research**, v.115, p.277-282, 2002.

HOUGH, A. P. L.; JONES, J. K. N. Mannose-containing polysaccharides. Part 3. The polysaccharides in the seeds of *Iris ochrooleuca* and *I. sibirica*. **Journal of Chemical Society**, p.1186-1192, 1953.

ISHRUD, O. *et al.* A water-soluble galactomannan from the seeds of *Phoenix dactylifera* L. **Carbohydrate Research**, v.335, p.297-301, 2001.

JAKOBSEN, H. B.; MARTENS, H.; LYSHEDE, O. B. Accumulation of metabolites during seed development in *Trifolium repens* L. **Annals of Botany**, v.74, p.409-415, 1994.

JARVIS, M. C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell Environment**, v.7, p.153-164, 1984.

JOSHI, H.; KAPOOR, V. P. *Cassia grandis* Linn. F. Seed galactomannan: structural and crystallographical studies. **Carbohydrate Research**, v.338, p.1907-1912, 2003.

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

KEEGSTRA, K.; RAIKHEL, N. Plant glycosyltransferases. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.219-224, 2001.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. **Carbohydrate Chemistry**, Clarend Press Oxford. New York, 1988.

KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.235-246, 2004.

KNOX, R. B. **Proceedings of the National Academy Science**, v.73, p.2788-2792, 1976.

KOOIMAN, P. Structures of the galactomannans from seeds of *Annona muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor*, and *Sophora japonica*. **Carbohydrate Research**, v.20, p.329-337, 1971.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural protein during the assembly of the Bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LAPASIN, R. *et al.* Flow properties of hydroxypropyl guar gum and its long-chain

hydrophobic derivatives. **Carbohydrate Polymer**, v.28, p.195-202, 1995.

LAUX, T.; JURGENS, G. Embryogenesis: a new start in life. **Plant Cell**, v.9, p.989-1000, 1997.

LERNER, D. R.; RAIKHEL, N. V. The gene for stinging nettle lectin encodes both a lectin and a chitinase. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.11085-11091, 1992.

LESCHZINER, C.; CERESO, A. S. The structure of a galactomannan from the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Carbohydrate Research**, v.15, p.291-299, 1970.

LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydrate Polymer**, v.46, p.157-163, 2001.

LIMA, D. U.; LOH, W.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.389-394, 2004.

LIMA, M. M. S. *et al.* **Latin American Applied Research**, v.26, p.1-3, 1996.

LIMA, R. da S. N. **Utilização da goma exsudada de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como biossensor para proteínas vegetais**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, 2002.

LIS, H.; LOTAN, R.; SHARON, N. Synthesis and use of affinity chromatography columns for the purification of plant lectins. Annual. N. Y. Acad. **Science**, v.234, p.232-238, 1974.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. STUMPF, P. K.; CONN, E. E., eds., **The Biochemistry of Plants**, v.6, p.371-447. Academic Press Inc., New York, 1981.

LOPES, M. A.; LARKINS B. A. Endosperm origin, development and function. **Plant Cell**, v.5, p.1383-1399, 1993.

LORENZI; H.; SOUZA, H. M.; BACHER, L. B. **Árvores Exóticas no Brasil**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. p.164, 2003.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LYSHEDE, O. B. Studies on mature seeds of *Cuscuta pedicellata* and *C. campestris* by electron microscopy. **Annals of Botany**, v.69, n.4, p.365-371, 1992.

MACHUKA, J. S. *et al.* Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v.51, n.6, p.721-728, 1999.

MAKELA, O. Studies in Haemagglutinins of *Leguminosae* seeds **Annals Medical Experience Biological Fennice**, v.35, p.1-156, 1957.

MALLETT, I.; McCLEARY, B. V.; MATHESON, N. K. Galactomannan changes in developing *Gleditsia triacanthos* seeds. **Phytochemistry**, v.26, n.7, p.1889-1894, 1987.

MANSFIELD, S. G.; BRIARTY, L. G. Cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve deposition. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.151-164, 1992.

MANSFIELD, S. G.; BRIARTY, L. G.; ERRI, S. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.447, 1991.

MANTELL, C. L. **The water soluble gums**. Reinhold Publishing Corporation, 1947. Citado por PAULA, 1990.

MARCHESI, V. T. Wheat germ (*Triticum vulgare*) agglutinin. **Methods in enzymology**, v.25, p. 354-356, 1972.

MATHESON, N. K.; SAINI, H. S. Polysaccharide and oligosaccharide changes in germinating lupin cotyledons. **Phytochemistry**, v.16, p.59-66, 1977.

MATOS, V. C. **Gomas endospérmicas de *Delonix regia* e *Schizolobium parahybae***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2000.

McCLEARY, B. V. *et al.* **Carbohydrate Research**, v.139, p.237-260, 1985.

McCLEARY, B. V.; MATHESON, N. K. Action patterns and substrate-binding requirements of β -D-mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v.119, p.191-219, 1983.

McCLENDON, J. H.; NOLAN, W. G.; WENZLER, H. F. The role of the endosperm in the germination of legumes: galactomannan, nitrogen and phosphorus changes in the germination of guar (*Cyamopsis tetragonoloba*; Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.63, p.790-797, 1976.

McNEIL, M. *et al.* Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v.53, p.625-663, 1984.

McQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M., COSGROVE, D. J. Two Endogenous Proteins That Induce Cell Wall Extension in Plants. **Plant Cell**, v.4, p.1425-1433, 1992.

MEIER, H.; REID, J. S. G. Morphological aspects of the galactomannan formation in the endosperm of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). **Planta**, v.133, p.243-248, 1977.

MESTECKINA, N. M. *et al.* Galactomannan from Ambiguous Crazyweed (*Oxytropis ambigua* (Pall.) DC). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.37, n.4, p.388-391, 2001.

MILLER, S. S. *et al.* Early development of the seed coat of soybean (*Glycine max*). **Annals of Botany**, v.84, p.297-304, 1999.

MIRELMAN, D. In: **Microbial Lectins and Agglutinins: Properties and Biological Activity**, p. 443, John Wiley and Sons, New York, 1986.

MISRA, A. N.; BAWEJA, J. M. **Indian Drugs**, v.34, n.4, p.216-223, 1997.

MO H. *et al.* *Xanthosoma sagittifolium* tubers contain a lectin with two different types of carbohydrate-binding sites. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.** v.274, n.19, p.33330-33305, 1999.

MOHNEN, D. Biosynthesis of pectins and galactomannans. In: P.B. (Ed.) **Carbohydrate and their Derivatives Including Tannins**, (Cellulose, and Related Lignins, v.3, p.497-527, Elsevier, Amsterdam, 1999.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C. **Lectinas de sementes de *Artocarpus incisa***. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, 2002.

MOREIRA, R. A. **Lectinas Vegetais. Uma Abordagem Química e Físico-Química**. Tese de Titular. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 600pp, 1998.

MOREIRA, R. A.; AINOUS, I. L. Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.): Isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. **Biologia Plantarum**, v.23, n.3, p.186-192, 1981.

MOREIRA, R. A. *et al.* Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v.47, n.7, p.1183-1188, 1998.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v.26, n.2, p.113-120, 1984.

MOREIRA, R. A. *et al.* **Plant Lectins**. In: Oliveira, B., Sgarbieri, V. (eds.). Proceedings of the first Brazilian Congress on Proteins, p.71-96, São Paulo, 1991.

MOREIRA, R. A. *et al.* Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var *megacarpa* lectin. **Phytochemistry**, v.46, n.1, p.139-144, 1997.

MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Lectins from the genus *Artocarpus*. **Biologia Plantarum**, v.25, n.5, p.343-348, 1983.

MOREIRA, R.A. *et al.* Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.) **Plant**, v.69, p.158-163, 1983.

MOREIRA, R.A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v.59, p.783-787, 1977.

MULIMANI, V. H.; PRASHANTH, S. J. Investigating plant galactomannans. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v.30, n.2, p.101-103, 2002.

NEDEVA, D.; NIKILOVA, A. Desiccation tolerance in developing seeds. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, v.23, n.3-4, p.100-113, 1997.

NOWELL, P. Phytohemagglutinin: An iniciator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**, v.20, p.462-466, 1960.

O'NEILL, M. A. *et al.* Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester – *in vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.22923-22930, 1996.

OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v.14, p.61-66, 1991.

OLSEN, A. Endosperm development: cellularization and cell fate specification. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.233-267, 2001.

OLSEN, O. A. Endosperm developments. **Plant Cell**, v.10, p.485-88, 1998.

OLSEN, O. A.; LINNESTAD, C., NICHOLS, S. E. Development biology of the cereal endosperm. **Trends in Plant Science**, v.4, p.253-57, 1999.

PADMA, P. *et al.* Purification in high yield and characterization of a new galactose specific lectin from the seed of *Trichosanthes cucumerina*. **Phytochemistry**, v.50, p.363-371, 1999.

PAULA, R. C. M. **Characterisation of Brazilian Tree Exsudate Gums from *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* B.** Tese de Doutorado apresentada ao Depto. de Química da Universidade de Manchester, 169 p., Oxford Road, 1995.

PAULA, R. C. M. **Goma de *Anacardium occidentale* L.: Isolamento, caracterização e estudo reológico.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Depto. de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, 138 p., Fortaleza, 1990.

PEACOCK, J. S.; COLSKY, A. S.; PINTO, V. B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. **Journal of Immunology**, v. 126, p.147-157, 1990.

PEREZ, G. *et al.* Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.2619-2621, 1991.

PERISSUTTI, G. E.; BRESOLIN, T. M. B.; GANTER, J. L. M. S. Interaction between the galactomannan from *Mimosa scabrella* and milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v.16, p.403-417, 2002.

PERRIN, R. M. *et al.* Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. **Science**, v.284, p.1976-1979, 1999.

PERRIN, R.; WILKERSON, C.; KEEGSTRA, K. Golgi enzymes that synthesize plant cell wall polysaccharides: finding and evaluating candidates in the genomic era. **Plant Molecular Biology**, v.47, p.115-130, 2001.

PETKOWICZ, C. L. O. *et al.* Conformation of galactomannan: experimental and modelling approaches. **Food Hydrocolloids**, v.13, p.263-266, 1999.

PETKOWICZ, C. L. O. *et al.* Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.107-112, 2001.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; MAZEAU, K. Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.25-39, 1998.

PETKOWICZ, C. L. O. *et al.* Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpinaceae. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p.737-743, 1998.

PETRI, W. A. Jr.; SMITH, R. D.; SCHLESSINGER, P. M. Isolation of the galactose binding lectin that mediates the "in vitro" adherence of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Clinical Investigation**, v.80, p.1238-1244, 1987.

PEUMANS, J. W.; VAN DAMME, E. J. M. The role lectin in the plant defense against insects. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v.10, p.128-141, 1994.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.

PHARMACIA BIOTHEC. **Gel filtration, Theory and Practic Pharmacia-LKB** Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1993.

PINTO, F. S. C. **Isolamento e caracterização das lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* L. var. *seminífera***. Dissertação de Mestrato, Universidade Federal do Ceará, 1987.

PIRES, L. *et al.* An active heparinoid obtained by sulphation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**, v.46, p.165-169, 2001.

PUSZTAI, A. **Plant Lectins**. Chemistry and Pharmacology of Natural Products Series. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 263, 1991.

QUICK, W. P.; SCHAFFER, A. A. Sucrose metabolism in sources and sinks, in **Photoassimilate Distribution in Plants and Crops, Source-Sink Relationships** (Zamski, E. and Schaffer, A.A., eds. p.115-156, Marcel Dekker, 1996.

RAE, A. L.; BONFANTE-FASOLO, P.; BREWIN, N. J. Structure and growth infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. **Plant Journal**, v.2, p.385-395, 1992.

REDGWELL, R. J. *et al.* Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica* L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. **Planta**, v.217, p.316-326, 2003.

REICHER, F. *et al.* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.28, n.29, p.353-361, 1991.

REICHER, F. *et al.* Seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34/35, p.349- 357, 1992.

REID, J. S. G. Structure and function in legume-seed polysaccharides, in: Brett C., Hillman J. R. (Eds.), **Biochemistry of the Plant Cell Walls**, Cambridge Univ. Press, p.259-268, 1985.

REID, J. S. G. *et al.* **Biochemical Society Transactions**, v.20, n.1, p.23-26, 1992.

REID, J. S. G. , MEIR, H. Formation of the endosperm galactomannan in leguminous seeds: preliminary communications. **Caryologia**, v.25, p.219-222, 1973.

REID, J. S. G. Cell wall storage carbohydrate in seeds-biochemistry of the seed "gums" and "hemicelluloses". **Advanced Botanical Research**, v.11, p.125-155, 1985.

REID, J. S. G. Reserve galactomannan metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). **Planta**, v.100, p.131-142, 1971.

REID, J. S. G.; DAVIES, C.; MEIR, H. *Endo-β*-mannanase, the leguminous aleurone layer and the storage galactomannan in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. **Planta**, v.133, p.219-222, 1977.

REID, J. S. G.; EDWARDS, M. E. in **Food Polysaccharides and their Applications**. Eds. A. M. Stephen and M. Dekker. Inc. New York, p.155-186, 1995.

REISS, R. Über die Natur der Reservecellulose und über ihre Auflösungweise bei der Keimung der Samen, *Landwirtsch Jahrb.*, v.18, p.711-765, 1889.

RICHARDSON, P. H.; WILLMER, J.; FOSTER, T. J. Dilute solution properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions. **Food Hydrocolloids**, v.12,:339-348, 1998.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v.57, p.929-967, 2001.

ROCHAT, C.; BOUTIN, J.- P.; Temporary storage compounds and sucrose-starch metabolism in seed coats during pea seed development (*Pisum sativum*). **Physiologia Plantarum**, v.85, p.567-572, 1992.

ROSE, J. K. C.; BENNETT, A.B. T. **Trends in Plant Science**, v.4, p.176-183,1999.

ROSE, J. K. C. *et al.* The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: Current Perspectives and a New Unifying Nomenclature. **Plant Cell Physiology**, v.43, p.1421-1435, 2002.

SCHEIBLE, W. R.; PAULY, M. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.285-295, 2004.

SCHERBUKHIN, V. D.; ANULOV, O. V. Legume seed galactomannans (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.35, n.3, p.229-244, 1999.

SCHULZE, E.; STEIGER, E. Zur Kenntnis des Paragalaktans, *landwirtsch. Vers. Stn.* v.41, p.220-223, 1892. Citado por Buckeridge *et al.*, 2000.

SEILER, A. Galaktomannanabbau in keimenden johannisbrodsamen (*Ceratonia siliqua* L.). **Planta**, v.134, p.209-221, 1977.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins– a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v.4, p.3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**, Chapman & Hall, London, 1989.

SHEN, Z. W. *et al.* Purification and properties of rice germ lectin. **Canadian Journal of Biochemistry and Cellular Biology**, v.62, p.1027-1032, 1984.

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, v.5, p.9-23, 1993.

SINGH, V. *et al.* **Carbohydrate Polymers**, v.33, n.2-3, p.203-205, 1997.

SINGH, V. *et al.* A non-ionic water-soluble seed gum from *Ipomoeae campanulata*. **Fitoterapia**, v.74, p.40-44, 2003 a.

SINGH, V. *et al.* R. *Ipomoea turpethum* seeds: a potential source of commercial gum. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.357-359, 2003 b.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v.4, p.365-375, 2001.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seed Galactomannans: An Overview. **Chemistry & Biodiversity**, v.2, p.295-317, 2005.

STEVENSON T. T.; DARVILL A. G.; ALBERSHEIM, P. Structural features of the plant cell-wall polysaccharides rhamnogalacturonona-II. **Carbohydrate Research**, v.182, p.207-226, 1988.

STONE, B. A.; CLARKE, A. E. **Chemistry and biology of (1→3)-β-glucans**. La Trobe University Press, Victoria, Australia, 1992.

STURM, A.; TANG, G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, v.4, n.10, p.401-407, 1999.

TANFORD, C. **Physical Chemistry of Macromolecules**. Wiley, New York, p.145-291, 1961. Citado po Dea & Morrison, 1975.

TAVARES, R. O. **Galactomanana de *Adenanthera pavonina* L. Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 95p. Fortaleza-Ceará, 1998.

TEIXEIRA, D. M. A. **Aplicação de gomas exsudadas de *Spondias purpurea* no isolamento de lectinas galactose-ligantes**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal

do Ceará, Fortaleza-Ceará, 2001.

TEIXEIRA, D. M. A. **Isolamento e Caracterização de um par lectina-receptor endógeno de semente de *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, 2005.

THOMPSON, J. L.; JONES, J. K. N. The glucomannan of bluebell seed (*Scylla nonscripta* L.). **Canadian Journal of Chemistry**, v.42, p.1088-1091, 1964.

TIMELL, T. E. **Advanced Carbohydrate Chemistry**, v.19, p.247-302, 1964.

TIMELL, T. E. **Advanced Carbohydrate Chemistry**, v.20, p.409-483, 1965.

TOMODA, M.; KITAMURA, M. The polysaccharide from *Lupinus luteus* seed. II. Purification and properties of two polysaccharides. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.15, p.1021-1024, 1967.

TRIEBOLD, H. O. **Quantitative analysis with applications to agricultural and food products**. New York D. Van Nostrand Co.; 331p, 1946.

TYMOWSKA-LALANNE Z., KREIS, M. The plant invertases: physiology, biochemistry, and molecular biology **Advanced Botanical Research**, v.28, p.71-117, 1998.

UNRAU, A. M.; CHOY, Y. M. Identification of linkages of a galactomannan isolated from seed of *Caesalpinia pulcherima*. **Carbohydrate Research**, v.14, p.151-158, 1970.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* **Handbook of Plant Lectins: Properties and Biochemical Applications**. 452 p., 1998.

VAN DONGEN, J. T. *et al.* Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. **Annals of Botany**, v.91, p. 729-737. 2003.

VAN HENGEL, A. J. *et al.* Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. **Plant Physiology**, v.117, p.43-53, 1998.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v.44, p.385-403, 2004.

VIDAL B. C. **Métodos em Biologia Celular**. IN: VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Biologia Celular, Rio de Janeiro, Atheneu, p.5-39,1987.

VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondrial ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Molecular Biology**, v.22, p.45-64, 1977.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v.9, n.4, p.203-209, 2004.

WEBB, M.C.; GUNNING B.E.S. The microtubular cytoskeleton during developmetn of the zygote, proembryo and free-nuclear endosperm in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynth. **Planta**, v.184, p.187-95, 1991.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Sugar import and metabolism during seed development. **Trends in Plant Science**, v.2, n.5, p.169-174, 169-174, 1997.

WESTERN, T. L.; SKINNER, D. J.; HAUGHN, G. W. Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. **Plant Physiology**, v.122, p.345-355, 2000.

WHISTLER, R. L **Industrial gums**, New York: Academic Press, p.306, 1973.

WHISTLER, R. L.; MILLER, J. N. Polysaccharides and their derivatives. In: **Industrial Gums**, New York: Academic press, 3^a Ed., 619p, 1993.

WHITMORE, F. W. A hemagglutinating substance in chitin. **Biotechniques**, v.12, n.2, p.202-208, 1992.

WINTER H.; HUBER SC. Regulation of sucrose metabolism in higher plants:localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.253-289, 2000.

WOBUS U.; WEBER H. Sugars as signal molecules in plant seed development. **Biological Chemistry**, v.390, p.937-944, 1999.

WOLFRON, M. L.; LAVER, M. L.; PATIN, D. L. Carbohydrates of the coffee bean. II isolation and characterization of mannan. **Journal of Organic Chemistry**, v.26, p.4533-4531, 1961.

ZAWADKI-BAGGIO, S. F. *et al.* linear (1→5)-linked α -L-arabinofuranan from the seeds of guapuruvu (*Schizolobium parahybum*). **Carbohydrate Research**, v.233, p.265-269, 1992.

ZENTENO; R. *et al.* Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**- v.127, p.243-250, 2000.