

SILVIA SCHAEFER

**Estudo dos polissacarídeos das  
sementes do gênero *Schizolobium***

Monografia da disciplina Estágio  
em Bioquímica, apresentada à  
Coordenação do Curso de Ciências  
Biológicas e Departamento de  
Bioquímica da UFPR, como  
requisito para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas

Curitiba  
2000

Orientadora:  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Fany Reicher

Aos meus pais, Anscar e Vania, que não mediram esforços para que eu pudesse seguir a minha vocação: ser bióloga. Obrigada pelo apoio e incentivo. Senti muita saudade durante os quatro anos que estivemos separados. Amo vocês demais...

É mais freqüente que a confiança seja gerada pela ignorância do que pelo conhecimento: são os que conhecem pouco, e não os que conhecem muito, os que afirmam tão positivamente que este ou aquele problema nunca será solucionado pela ciência.

(Charles Darwin, 1871)

## AGRADECIMENTOS

À Professora Fany, por me orientar durante a iniciação científica e por conduzir este trabalho de monografia. Obrigada pelo apoio e estímulo para sempre seguir em frente...

Ao Prof. Dr. Yedo Alquini, do Departamento de Botânica, pela discussão da anatomia das sementes.

Ao meu irmão, Henrique, pelo companheirismo, apoio, companhia e amizade. Mano, te amo... Você é o melhor irmão do mundo! Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos novos irmãos que encontrei na faculdade: Adriano, Eloisa e Lilian. Obrigada pela sua amizade. Meus companheiros de estudo, festas, confidências... Eu já falei que amo vocês?

Aos meus companheiros de laboratório:

Ana Paula, com todo esse jeito de quietinha, você sempre tem um comentário certo para fazer no momento apropriado. Você é muito divertida e ótima amiga...

Andréa, obrigada pelas intermináveis análises no glc e pela sua amizade.

Angela, sempre alegrando a todos por onde passa. E aí "treim verrrrrdi"?

Carmen, que tanto me ajudou neste trabalho. Seus conselhos e amizade foram valiosíssimos.

Eliana, obrigada por me conduzir nos primeiros e decisivos passos no mundo da pesquisa em química de carboidratos. Você é demais!

Fabíola, esse seu jeitinho meigo conquista qualquer um. Você é um doce.

Gisele, valeu pelas conversas, pelos conselhos, pelo ombro amigo de todas as horas... Te adoro!

Juan, que bom que um dia um físico resolveu cair de pára-quadras no meio de um bando de bioquímicos e pudemos nos conhecer. Você é maravilhoso. Te adoro demais... E obrigada pelas análises de HPSEC-MALLS.

Luciane, você tem um coração do tamanho do mundo, apesar dessa sua fama de durona. Você é uma pessoa incrível, que qualquer um gostaria de ter como amiga...

Renato, "Tudo Béiiiiim"? Valeu pelas festas (bons tempos...) e pelos bons momentos que passamos! Você é muito legal! Hop, hop!

Todos vocês fizeram com que o trabalho no laboratório se tornasse muito mais divertido e agradável! Vocês sempre estarão em meu coração...

A todos os professores do Departamento de Bioquímica que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À todas as pessoas que conheci na bioquímica e que tornaram-se minhas amigas. Companheiros de almoço, de cantina, de conversas pelos corredores, de festas. Obrigada...

À Rô, da coordenação do curso de Biologia, sempre pronta a tirar qualquer dúvida, quebrar qualquer galho e ajudar no que for preciso... Você é o anjo dos estudantes de Biologia!

Aos meus colegas da Biologia que tornaram-se meus amigos e fizeram da faculdade uma grande festa: Carol, Luciano, Larissa, Flávia Galindo, Sabine, Juliana Margarida, Rebeca, Renata, Ramoci, Fábio, Luciana, gêmeas (Renata e Fernanda), Gustavo Malheiros, Gustavo Souza, Guilherme, Andréa, Vivian, Flávia Fontoura e muitos outros... Valeu por tudo!

À EMBRAPA Florestas, pelo fornecimento das sementes.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de siglas.....	xiii
1 Introdução.....	1
1.1 Sementes.....	1
1.1.1 Desenvolvimento da semente.....	1
1.1.2 Formação do embrião.....	3
1.1.3 Germinação da semente.....	5
1.1.4 Do embrião à planta adulta.....	6
1.2 Polissacarídeos.....	9
1.3 Mananas.....	11
1.4 <i>Schizolobium parahybae</i> .....	12
1.5 <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	13
2 Objetivos.....	15
3 Materiais e Métodos.....	16
3.1 Extração das mananas de <i>Schizolobium parahybae</i> (guapuruvu) e <i>Schizolobium amazonicum</i> (pinho cuiabano).....	16
3.2 Hidrólise.....	18
3.3 Hidrólise de Saeman.....	18
3.4 Redução.....	18
3.5 Acetilação.....	19
3.6 Cromatografia líquido gasosa (glc).....	19

3.7	Cromatografia de exclusão estérica acoplada a espalhamento de luz de multiângulos (HPSEC-MALLS) e detector de índice de refração (Waters 2410).....	20
3.8	Estudos macroscópicos das sementes de <i>Schizolobium parahybae</i> e <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	22
3.9	Germinação das sementes de <i>Schizolobium parahybae</i> e <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	22
3.10	Autoclavagem da vermiculita.....	23
3.11	Preparação das sementes germinadas para análise.....	23
4	Resultados e Discussão.....	25
4.1	Extração das mananas.....	25
4.1.1	<i>Schizolobium parahybae</i> .....	26
4.1.2	<i>Schizolobium amazonicum</i> .....	27
4.1.3	Análise comparativa das espécies <i>Schizolobium parahybae</i> e <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	28
4.2	Aspectos macroscópicos das sementes de <i>Schizolobium parahybae</i> e <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	30
4.3	Germinação de <i>Schizolobium parahybae</i> e <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	37
4.3.1	Experimento 1.....	37
4.3.2	Experimento 2.....	38
4.3.3	Experimento 3.....	40
5	Conclusão.....	52
6	Referências Bibliográficas.....	53



## LISTA DE TABELAS

I	Composição monossacarídica das membranas do endosperma de <i>Schizolobium parahybae</i> .....	26
II	Composição monossacarídica das membranas do endosperma de <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	27
III	Composição monossacarídica das frações obtidas do resíduo proveniente das extrações aquosas das membranas de <i>Schizolobium parahybae</i> e <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	28
IV	Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações alcalinas das membranas externas de <i>Schizolobium parahybae</i> e <i>Schizolobium amazonicum</i> .....	29
V	Massa (em gramas) das membranas externas e internas e géis de <i>Schizolobium parahybae</i> após a germinação.....	40
VI	Composição monossacarídica (em %) das membranas internas das sementes de <i>Schizolobium parahybae</i> nos vários tempos de germinação.....	41
VII	Composição monossacarídica (em %) das membranas externas das sementes de <i>Schizolobium parahybae</i> nos vários tempos de germinação.....	42

VIII	Composição monossacarídica (em %) das membranas externas das sementes de <i>Schizolobium parahybae</i> nos vários tempos de germinação, considerando apenas os conteúdos de manose e galactose.....	43
IX	Composição monossacarídica (em %) dos géis de <i>Schizolobium parahybae</i> após a germinação das sementes.....	44

## LISTA DE FIGURAS

1.	Sementes e estágios de germinação de algumas dicotiledôneas comuns.....	8
2.	Visão geral das sementes de <i>S. amazonicum</i> , mostrando todas as suas partes isoladas.....	30
3.	Sementes de <i>S. amazonicum</i> .....	31
4.	Sementes de <i>S. amazonicum</i> , mostrando seu endosperma, suas membranas isoladas e gel.....	32
5.	Visão geral das sementes de <i>S. parahybae</i> , mostrando todas as suas partes isoladas.....	33
6.	Sementes inteiras de <i>S. parahybae</i> .....	34
7.	Sementes abertas de <i>S. parahybae</i> .....	35
8.	Sementes de <i>S. parahybae</i> , mostrando suas membranas isoladas e gel.....	36
9.	Teste de homogeneidade realizado com o gel T <sub>0</sub> , por HPSEC-MALLS.....	45
10.	Teste de homogeneidade realizado com o gel T <sub>1</sub> , por HPSEC-MALLS.....	46

11.	Teste de homogeneidade realizado com o gel T <sub>3</sub> , por HPSEC-MALLS.....	47
12.	Teste de homogeneidade realizado com o gel T <sub>4</sub> , por HPSEC-MALLS.....	48
13.	Teste de homogeneidade realizado com o gel T <sub>5</sub> , por HPSEC-MALLS.....	49
14.	Gráfico de massa cumulativa mostrando os géis T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> , T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> e T <sub>5</sub> .....	50

## LISTA DE SIGLAS

- 1<sup>a</sup> Ext. aquosa = Primeira extração aquosa em refluxo (100°C)  
1<sup>a</sup> alcalina = Primeira extração alcalina (à temperatura ambiente)  
2<sup>a</sup> alcalina = Segunda extração alcalina (à temperatura ambiente)  
3<sup>a</sup> alcalina = Terceira extração alcalina (em refluxo, 100°C)  
Ara = Arabinose  
BaCO<sub>3</sub> = Carbonato de bário  
<sup>13</sup>C-RMN = Ressonância magnética nuclear de Carbono 13  
CuSO<sub>4</sub> = Sulfato de cobre  
dn/dc = Variação do índice de refração da solução do material analisado com a variação de sua concentração  
EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Ext. aquosa = Extração aquosa ( em refluxo, 100°C)  
Gal = Galactose  
glc = Cromatografia líquido gasosa  
Glc = Glucose  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = Ácido sulfúrico  
HPLC =  
HPSEC-MALLS = Cromatografia de exclusão estérica acoplada a espalhamento de luz de multiângulos  
IR = Índice de refração  
Man = Manose  
Man:Gal = Relação manose:galactose  
ME = Membrana externa  
MI = Membrana interna  
M<sub>w</sub> = Massa molar média

$\text{Na}^+$  = Íon sódio

$\text{NaBH}_4$  = Boridreto de sódio

$\text{NaN}_3$  = Azida de sódio

$\text{NaNO}_2$  = Nitrito de sódio

$\text{NaOH}$  = Hidróxido de Sódio

ppm = Partes por milhão

Rel Man:Gal = Relação manose:galactose

rpm = Rotações por minuto

T<sub>0</sub>: sementes inchadas, antes do plantio

T<sub>1</sub>: sementes retiradas no primeiro dia de germinação

T<sub>2</sub>: sementes retiradas no segundo dia de germinação

T<sub>3</sub>: sementes retiradas no terceiro dia de germinação

T<sub>4</sub>: sementes retiradas no quarto dia de germinação

T<sub>5</sub>: sementes retiradas no quinto dia de germinação

T<sub>6</sub>: sementes retiradas no sexto dia de germinação

T<sub>10</sub>: sementes retiradas no décimo dia de germinação

T<sub>12</sub>: sementes retiradas no décimo segundo dia de germinação

TFA = Ácido trifluoracético

Xil = Xilose

## 1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira, está entre as mais ricas e importantes do mundo sob o ponto de vista de vários aspectos, como por exemplo, em termos numéricos, econômicos, ornamentais, ecológicos e medicinais.

Esta grande diversidade de plantas, com frutificação ocorrendo durante todo o ano, fornece alimento de forma contínua e equilibrada e dá proteção à fauna, contribuindo para o seu desenvolvimento.

Existem no Brasil espécies nativas e espécies exóticas. Estas últimas foram aqui introduzidas para exploração, principalmente econômica, de seus produtos.

Dentre as espécies cultivadas e nativas, encontram-se plantas cujas sementes são ricas em óleo, proteínas e polissacarídeos.

### 1.1 Sementes

#### 1.1.1 Desenvolvimento da semente (RAVEN, 1996)

Com a deiscência das anteras nas flores de Angiospermas (Divisão Magnoliophyta), os grãos de pólen são transferidos aos estigmas por uma variedade de vetores (insetos, vento, água, aves, mamíferos, entre outros). O processo pelo qual isto ocorre é chamado polinização. A fecundação da oosfera (gametófito feminino) para formação do embrião e a fecundação dos núcleos polares (presentes no óvulo, no interior do ovário da flor) para formação do endosperma ocorre em seguida. Este último processo é chamado fusão tripla, já que os núcleos polares são fecundados pelos dois núcleos espermáticos do grão de pólen (estrutura masculina), resultando numa única célula triplóide denominada núcleo primário do endosperma.

Após a dupla fecundação (da oosfera e dos núcleos polares) muitos processos são iniciados: o núcleo primário do endosperma divide-se, formando o endosperma; o zigoto desenvolve-se em um embrião, os tegumentos

desenvolvem-se em uma cobertura da semente; e a parede do ovário e estruturas associadas desenvolvem-se no fruto.

Nos estágios iniciais de desenvolvimento, os embriões das dicotiledôneas e monocotiledôneas seguem seqüências semelhantes de divisão celular, ambas tornando-se corpos esféricos. É com a formação dos cotilédones que uma primeira distinção aparece: as dicotiledôneas desenvolvem dois cotilédones e as monocotiledôneas formam apenas um.

A formação do endosperma começa com a divisão mitótica do núcleo primário do endosperma, e usualmente ocorre antes da primeira divisão do zigoto. Em algumas angiospermas, um número variável de divisões nucleares precede a formação de parede celular (formação de endosperma do tipo nuclear); em outras espécies a mitose inicial e as subseqüentes são seguidas de citocinese (formação do embrião do tipo celular). Embora o desenvolvimento do endosperma possa ocorrer de formas variadas, a função do tecido resultante permanece a mesma: fornecer nutrientes básicos para o embrião em desenvolvimento e, em muitos casos, também para as plântulas jovens. Em muitas dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas, a maioria destas reservas é absorvida pelo embrião em desenvolvimento, antes da semente tornar-se dormente, como em ervilhas e feijões. Os embriões de tais sementes comumente desenvolvem cotilédones carnosos e com reservas de alimentos. As principais substâncias armazenadas nas sementes são carboidratos, proteínas e lipídios.

As sementes das angiospermas diferem daquelas das gimnospermas pela origem de seu material armazenado. Nas gimnospermas o alimento armazenado é fornecido pelo gametófito feminino; nas angiospermas, ele é fornecido, ao menos inicialmente, pelo endosperma, que não é um tecido nem gametofítico, nem esporofítico.

Concomitantemente com o desenvolvimento do óvulo em uma semente, o ovário (e algumas vezes outras partes da flor e inflorescência) desenvolve-se em fruto. Com isso, a parede do ovário ou pericarpo, freqüentemente espessa-se e torna-se diferenciada em camadas distintas: o exocarpo (camada externa), o mesocarpo (camada média) e o endocarpo



(camada interna), ou somente exocarpo e endocarpo. Estas camadas são geralmente mais conspícuas em frutos carnosos do que em frutos secos.

### **1.1.2 Formação do embrião (RAVEN, 1996)**

O embrião maduro das plantas floríferas consiste em um eixo semelhante ao caule, portando um ou dois cotilédones. Os cotilédones, algumas vezes referidos como folhas seminais, são as primeiras folhas do esporófito jovem.

Nas extremidades opostas do eixo do embrião encontram-se os meristemas apicais do eixo caulinar e da raiz. Os meristemas apicais são encontrados nas extremidades de todos os eixos caulinares e de raízes. Os meristemas são constituídos por células meristemáticas, capazes de divisões repetidas. Na extremidade inferior, há uma raiz embrionária ou radícula, com características evidentes de raiz. Em muitas plantas, entretanto, a extremidade inferior do eixo consiste em pouco mais do que um meristema apical recoberto por uma coifa. Se a radícula não pode ser distinta no embrião, o eixo do embrião abaixo dos cotilédones é chamado eixo hipocótilo-radicular.

Em muitas dicotiledôneas a maioria ou todo o endosperma e o perisperma (se presente) é absorvida pelo embrião em desenvolvimento, e os embriões de tais sementes desenvolvem cotilédones suculentos que reservam alimento. Os cotilédones da maioria dos embriões das dicotiledôneas são suculentos e ocupam o maior volume da semente. Exemplos familiares de semente sem endosperma são o girassol, a noz, o feijão e a ervilha. Nas dicotiledôneas com grande quantidade de endosperma (por exemplo a mamona), os cotilédones são delgados e membranosos (figura 1-b) e servem para absorver substâncias de reserva do endosperma e durante o início do crescimento do embrião.

Nas monocotiledôneas, o único cotilédone, além de funcionar como órgão de reserva ou fotossintetizante, também realiza a função de absorção. Mergulhado no endosperma, o cotilédone absorve nutrientes digeridos pela atividade enzimática. As substâncias digeridas são então movidas por meio do

cotilédone para as regiões de crescimento do embrião. Entre os embriões das monocotiledôneas altamente diferenciados estão aqueles das gramíneas. Quando totalmente formado, o embrião das gramíneas possui um cotilédone maciço, o escutelo, que funciona na absorção das substâncias de reserva do endosperma.

Todas as sementes são envolvidas por um tegumento, que se desenvolve a partir do(s) tegumento(s) do óvulo e fornece proteção para o embrião incluso. O tegumento da semente, em geral, é muito mais delgado do que o(s) tegumento(s) a partir do(s) qual(is) foi formado. O tegumento delgado e seco pode ter uma textura papirácea, mas em muitas sementes é muito duro e altamente impermeável à água. A micrópila (abertura nos tegumentos) é freqüentemente visível sobre o tegumento como um pequeno poro. Comumente, a micrópila é associada ao hilo, uma cicatriz deixada sobre o tegumento, depois que a semente separou-se do seu pedúnculo ou funículo.

Os primeiros estágios da embriogênese, ou desenvolvimento do embrião, são os mesmos nas dicotiledôneas e monocotiledôneas. A formação do embrião começa com a divisão da oosfera fertilizada ou zigoto, dentro do saco embrionário do óvulo. Na maioria das plantas floríferas, a primeira divisão do zigoto é transversal em relação ao seu eixo maior. Com esta divisão, fica estabelecida a polaridade do embrião: o pólo superior (calazal) é o principal sítio do crescimento do embrião; o pólo inferior (micropilar) produz um suspensor, como um pedúnculo, que ancora o embrião na região da micrópila.

Através de uma progressão de divisões ordenadas, o embrião finalmente diferencia-se em uma estrutura aproximadamente esférica – o embrião propriamente dito – e o suspensor. Antes desse estágio ser alcançado, o embrião em desenvolvimento é geralmente denominado pró-embrião.

No passado, acreditava-se que os suspensores empurravam os embriões para dentro dos tecidos nutritivos. Atualmente, parece que os suspensores das angiospermas são também envolvidos ativamente na absorção dos nutrientes do endosperma. Além disso, em alguns embriões, substâncias protéicas fabricadas no suspensor são aparentemente utilizadas pelo próprio embrião durante períodos de rápido crescimento.

Durante o período de formação do embrião, há um fluxo contínuo de nutrientes da planta-mãe para os tecidos do óvulo, resultando em um estoque maciço de reservas de alimento dentro do endosperma, perisperma ou cotilédones da semente que está se desenvolvendo. Eventualmente, o pedúnculo ou funículo, que conecta o óvulo à parede do ovário, separa-se do óvulo e o último torna-se um sistema nutricionalmente fechado. Finalmente, a semente torna-se dessecada à medida que perde água para o ambiente circundante e o tegumento endurece, envolvendo o embrião e nutrientes de reserva numa “armadura protetora”.

### **1.1.3 Germinação da semente (RAVEN, 1996)**

O crescimento do embrião é geralmente retardado enquanto a semente amadurece e é disseminada. O reinício do crescimento do embrião ou germinação da semente depende de muitos fatores externos e internos. Entre os fatores externos ou ambientais, três são especialmente importantes: a água, o oxigênio e a temperatura.

A maioria das sementes maduras é extremamente seca, contendo normalmente apenas 5 a 20% de água do seu peso total. Deste modo, a germinação não é possível até que a semente absorva a água necessária para as atividades metabólicas. Enzimas já presentes na semente são ativadas e outras são sintetizadas para a digestão e utilização dos nutrientes de reserva acumulados nas células da semente, durante o período de formação do embrião. As mesmas células que inicialmente sintetizavam imensas quantidades de materiais de reserva agora invertem completamente seus processos metabólicos. O aumento e divisão celulares são iniciados no embrião e seguem os padrões característicos das espécies. O crescimento posterior requer um contínuo suprimento de água e nutrientes. À medida em que a semente absorve água, ela entumesce, e considerável pressão pode ser desenvolvida no seu interior. A este processo dá-se o nome de embebição, e em plantas, ocorre principalmente em sementes, as quais podem aumentar até

várias vezes seu tamanho original. A embebição é essencial no processo de germinação das sementes.

Durante os estágios iniciais da germinação, a respiração pode ser inteiramente anaeróbica, mas tão logo o tegumento seja rompido, a semente assume a respiração aeróbica, que requer oxigênio. Se o solo não estiver saturado, a quantidade de oxigênio disponível para a semente pode ser inadequada para a respiração aeróbica, e a plântula não se desenvolverá corretamente.

Embora muitas sementes germinem dentro de uma faixa ampla de temperatura, elas geralmente não germinarão abaixo ou acima de uma certa faixa específica de temperatura para a espécie. A temperatura mínima para muitas espécies está entre 0 e 5°C; a máxima, entre 45 e 48°C; e a faixa ótima, entre 25 e 30°C.

Algumas sementes não germinam mesmo quando as condições externas são favoráveis. Tais sementes são ditas dormentes. As causas mais comuns de dormência nas sementes são a imaturidade fisiológica do embrião e a impermeabilidade do tegumento à água e, algumas vezes, ao oxigênio. Algumas sementes fisiologicamente imaturas, antes de germinarem, devem sofrer uma série complexa de mudanças bioquímicas e enzimáticas, coletivamente chamadas pós-maturação. Em regiões temperadas, a pós-maturação é desencadeada pelas baixas temperaturas do inverno. Então, a necessidade de um período de pós-maturação ajuda a evitar a germinação da semente durante o período rigoroso do inverno, quando seria improvável que a mesma sobrevivesse.

A dormência é de grande valor para a sobrevivência da planta. Como no exemplo da pós-maturação, ela é um meio que assegura as condições favoráveis para o crescimento da plântula quando ocorrer a germinação.

#### **1.1.4 Do embrião à planta adulta (RAVEN, 1996)**

Quando ocorre a germinação, a primeira estrutura a emergir na maioria das sementes é a radícula, ou raiz embrionária; esta possibilita à plântula em

desenvolvimento fixar-se no solo e absorver água. À medida que esta primeira raiz, chamada raiz primária, cresce, ela forma ramificações ou raízes laterais e estas raízes, por sua vez, podem originar raízes laterais adicionais. Deste modo, desenvolve-se um sistema radicular muito ramificado. Este processo é válido para as dicotiledôneas, já que as monocotiledôneas desenvolvem seu sistema radicular a partir de raízes adventícias.

A maneira pela qual o eixo caulinar emerge da semente durante a germinação varia de espécie para espécie. Por exemplo, depois que a raiz emerge da semente do feijão (*Phaseolus vulgaris*), o hipocótilo alonga-se e encurva-se no processo (Figura 1-a). Assim, a delicada extremidade do eixo caulinar é protegida de injúria por ser puxada ao invés de ser empurrada no solo. Quando a dobra ou gancho, como é chamado, alcança a superfície do solo, ela se torna ereta e puxa os cotilédones e a plúmula para o ar. Este tipo de germinação de semente, na qual os cotilédones são elevados acima do nível do solo, é chamada epígea. Durante a germinação e subsequente desenvolvimento da plântula, as substâncias armazenadas nos cotilédones são digeridas e os produtos são transportados para os órgãos em crescimento da planta jovem. Os cotilédones diminuem gradualmente de tamanho, murcham e geralmente caem. Nesta altura, a plântula está estabelecida, isto é, não mais depende dos nutrientes de reserva da semente para sua alimentação. A plântula é agora um organismo autotrófico fotossintetizante.

A germinação da mamona (*Ricinus communis*) (Figura 1-b) é semelhante, essencialmente à do feijão, exceto que na mamona os nutrientes de reserva são encontrados no endosperma. À medida que o gancho se torna ereto, o endosperma e geralmente o tegumento da semente são elevados juntamente com os cotilédones e a plúmula (porção do eixo caulinar jovem acima dos cotilédones). Durante este período, os alimentos digeridos do endosperma são absorvidos pelos cotilédones e são transportados para os órgãos em crescimento da plântula. Em ambos, feijão e mamona, os cotilédones tornam-se verdes mediante exposição à luz, mas não tem função fotossintetizante importante.

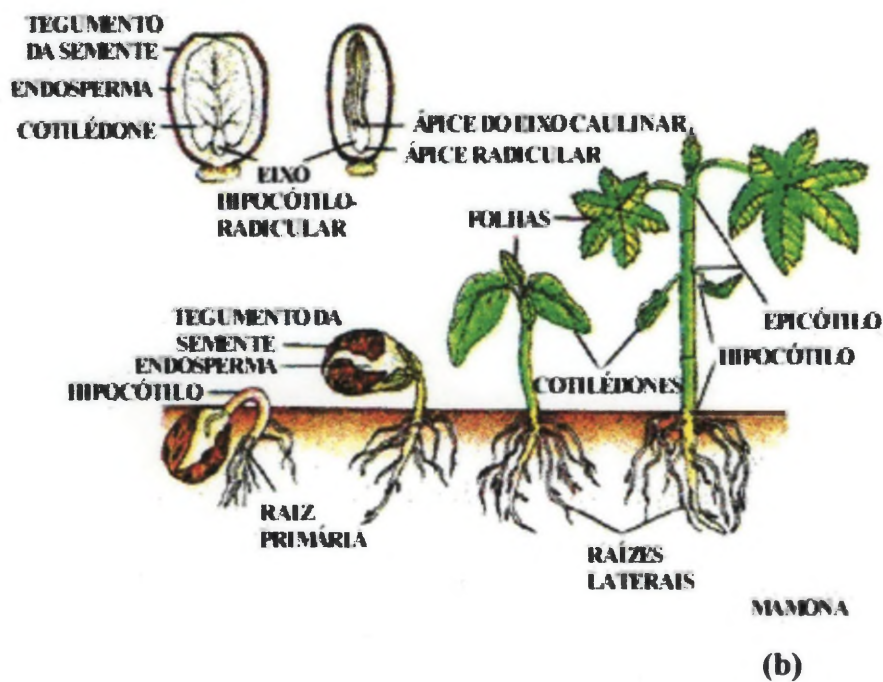
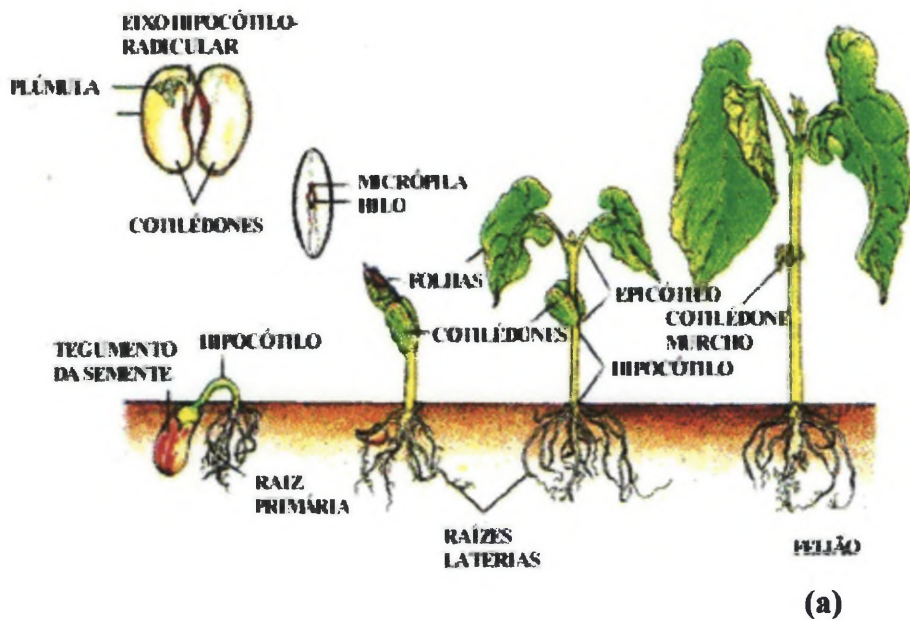


FIGURA 1 – Sementes e estágios de germinação de algumas dicotiledôneas comuns. ( a ) Feijão (*Phaseolus vulgaris*); semente aberta e vista externa. ( b ) Mamona (*Ricinus communis*), semente aberta e mostrando vistas lateral e frontal do embrião. (RAVEN, 1996)

## 1.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são as macromoléculas existentes em maior quantidade e mais amplamente distribuídas na Terra. São formados por unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas (LEHNINGER *et al*, 1995).

Do ponto de vista biológico, as galactomananas, encontradas no endosperma das sementes de leguminosas tem sido caracterizadas como polissacarídeos de reserva. Na maioria das outras plantas, o polissacarídeo utilizado como reserva nas sementes é o amido. Os polissacarídeos de reserva parecem estar envolvidos no mecanismo de sobrevivência do embrião, evitando a sua dessecação em condições adversas. (REID, 1997)

Segundo PETKOWICZ *et al* (1998), as galactomananas de *S. parahybae* e *S. amazonicum* são estruturalmente idênticas para as mesmas condições de extração (extração aquosa a 4°C), apresentando a mesma relação manose-galactose (3,0:1), constituindo a fração principal de galactomananas. Com extrações aquosas a 25°C e 60°C, obteve-se galactomananas com relação manose:galactose 4,0:1 e 4,3:1, respectivamente. Ao serem submetidas a extrações mais drásticas, a relação manose:galactose aumentou gradativamente, até culminar em uma manana (insolúvel).

Galactomananas são macromoléculas constituídas de uma cadeia principal de unidades de manose ligadas umas às outras por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  e que possuem ramificações laterais de unidades de galactose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow6)$ . As ramificações de unidades de galactose favorecem a solubilidade das galactomananas em água. Níveis de no mínimo 10% de galactose são necessários para a solubilidade em água (DEA, 1987).

As galactomananas podem apresentar diferenças entre as espécies vegetais pela distribuição e proporção de unidades de galactose presentes no polímero, que varia entre proporções de 50% e 16%, conforme a espécie vegetal da qual a galactomanana foi retirada (HORVEY & WICKSTROM, 1964).

Esta proporção também pode variar de acordo com o tipo de extração para obtenção de polissacarídeos feita com um mesmo vegetal, como por exemplo, extração aquosa, alcalina, entre outras.

Uma comparação nas viscosidades de uma série de galactomananas com diferentes conteúdos de galactose nas ramificações revelaram diminuição na viscosidade após remoção enzimática de mais de 75% da galactose. Quando os níveis de galactose na molécula eram menores de 10%, havia precipitação na solução, revelando a presença de molécula insolúvel (manana) (YALPANI, 1988).

Durante a germinação, a biodegradação das galactomananas requer a presença de três enzimas nas sementes: a  $\alpha$ -D-galactosidase, uma exopolissacaridase, para a remoção de cadeias (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-galactose;  $\beta$ -D-mananase, uma endoenzima que hidrolisa cadeias de mananas ligadas  $\beta$ -D(1 $\rightarrow$ 4) em oligossacarídeos; e  $\beta$ -D-manosidase, uma glicosidase para hidrólise completa de D-mano-oligossacarídeos para manose (DEY, 1978).

Em galactomananas de “fenugreek” (*Trigonella foenum-graecum*, família Fabaceae) nos primeiros estágios da germinação, os oligossacarídeos da família da rafinose são metabolizados no endosperma e cotilédones, através da clivagem hidrolítica das ligações  $\alpha$ -galactosídicas (REID, 1971).

Os oligossacarídeos pertencentes à família da rafinose são  $\alpha$ -galactosídeos, contendo galactose com ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), são importantes na nutrição animal e tem efeito na atividade de flatulência (WAGNER *et al.*, 1976; RACKIS, 1975). Estes derivados de sacarose são acumulados em folhas durante a fotossíntese e nas sementes durante a maturação (DEY, 1985). Os oligossacarídeos da série rafinose são sintetizadas no endosperma simultaneamente com a deposição de galactomanana, resultado de uma possível transformação da sacarose (SINGH *et al.*, 1990). Pensa-se que o papel primário da série rafinose em sementes maduras e folhas é o de prover uma alternativa aos polissacarídeos como reserva em condições de baixas temperaturas de crescimento (CHATTERTON *et al.*, 1990).



Carboidratos de baixa massa molecular da família da rafinose foram isolados e estudados por GANTER *et al.* (1991) nas sementes de *Mimosa scabrella*, conhecida como bracatinga e membro da família Mimosaceae, do grupo das Leguminosas.

Durante a biodegradação das galactomananas, grandes quantidades de galactose e manose livres estão presentes no endosperma, mas nenhum açúcar é detectado nos cotilédones. Os açúcares do endosperma são absorvidos pelos cotilédones, o que é evidenciado pela síntese do amido e por um constante alto nível de carboidratos de baixo peso molecular durante o período de mobilização das galactomananas. A galactose e a manose, segundo REID (1971), são rapidamente transformadas nos cotilédones. A mobilização das galactomananas no endosperma e a formação de amido nos cotilédones ocorre simultaneamente. É possível que os açúcares livres ao entrarem nos cotilédones sejam transformados em sacarose, e o aumento no nível de sacarose resultar na formação do amido, talvez por um sistema sacarose-sintetase amido-sintetase. É interessante notar que embora os cotilédones das sementes sejam capazes de sintetizar amido, eles não o fazem até a germinação. O principal carboidrato de reserva presente durante o período de dormência é a galactomanana no endosperma (REID, 1971).

### 1.3 Mananas

Nos vegetais, as mananas podem ser encontradas principalmente em parede celular do endosperma das sementes maduras de plantas não leguminosas (STEPHEN, 1983).

As mananas de fontes vegetais contém cadeias lineares de unidades de  $\beta$ -D-manose unidas por ligações 1 $\rightarrow$ 4. Mananas  $\beta$ -D(1 $\rightarrow$ 4) ligadas também são encontradas como constituintes de parede celular de muitas algas verdes e de algumas algas vermelhas. A parede celular de muitas leveduras apresenta mananas ligadas covalentemente a proteína, onde representam um componente estrutural (GORIN & MAZUREK, 1975).

São consideradas mananas verdadeiras, aqueles polissacarídeos que contêm 95% ou mais de unidades de D-manose, embora alguns autores estabeleçam esse limite em 85% (STEPHEN, 1983).

Freqüentemente são referidas dificuldades na hidrólise de mananas, na análise de periodato e a metilação destes polímeros (ASPINALL, 1953; DUTTON & HUNT, 1958; JONES, 1950).

As mananas do endosperma de *Phytelephas macrocarpa*, conhecida como "ivory nut", da família Palmae, são as mais estudadas e melhor caracterizadas na literatura e apresentam função de reserva (AVIGAD e DEY, 1997).

Uma manana isolada pela primeira vez em leguminosas foi obtida do endosperma de *S. amazonicum*. Os padrões de difração de raios-X e difração de elétron foram típicos de uma  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-manana pura. Os dados de metilação e  $^{13}\text{C}$ -RMN confirmaram a estrutura. Os resultados de microscopia eletrônica indicam que a manana ocorre na forma microfibrilar (PETKOWICZ *et al*, 1998).

No presente trabalho, os polissacarídeos (mais especificamente mananas) de duas espécies nativas são alvos de estudo: as mananas do endosperma de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu) e *Schizolobium amazonicum* (pinho cuiabano) da família Caesalpiniaceae (LORENZI, 1992; JOLY, 1993).

Ambas as espécies (*S. parahybae* e *S. amazonicum*) são dicotiledôneas, possuindo portanto, dois cotilédones (JOLY, 1993).

#### **1.4 *Schizolobium parahybae***

Esta é uma árvore de grande porte, conhecida vulgarmente como guapuruvu, com alturas que variam de 20-30 m e com troncos que podem chegar até a 80cm de diâmetro na idade adulta. Suas folhas são compostas, bipinadas, possuindo de 80-100 cm de comprimento, com 30-50 pinas opostas.

Sua ocorrência vai desde a Bahia até Santa Catarina, na floresta pluvial da encosta atlântica, sendo planta característica da Floresta Atlântica. É muito encontrada nas planícies aluviais ao longo dos rios. Nas depressões das

encostas chega a formar densos agrupamentos, mas prefere as matas abertas e capoeiras, sendo rara na floresta primária densa. É uma das plantas nativas de mais rápido crescimento.

É uma planta bastante ornamental quando em flor, porém não é recomendada para arborização de lugares muito freqüentados devido ao risco de acidentes pela fácil queda de ramos em dias de vento. É ótima para reflorestamentos de áreas degradadas de preservação permanente em composições mistas.

Floresce a partir do final de agosto com a planta totalmente despida de folhagem, prolongando-se até meados de outubro. Os frutos amadurecem em abril-julho (LORENZI, 1992).

### **1.5 *Schizolobium amazonicum***

Esta é uma árvore de grande porte e crescimento veloz, muito semelhante ao *Schizolobium parahybae*, distinguindo-se deste por possuir folhas, frutos e sementes menores, bem como pelas pétalas mais oblongas, mais firmes e glabras e pedicelos articulados.

Ocorre abundantemente no Pará e Amazonas, sendo conhecido como pinho cuiabano.

A espécie foi classificada, mas não descrita e durante algum tempo foi considerada como sendo o *S. parahybae*. Estudos posteriores sugeriram tratar-se de uma espécie autônoma, apesar dos caracteres gerais serem quase idênticos.

Com a dúvida acima citada, botânicos norte-americanos estudaram material deste gênero freqüente na América Central e chegaram à conclusão de que a espécie abundante nesta região se trata do *Schizolobium parahybae*. Desta forma, parece que na Amazônia desaparece o *Schizolobium parahybae*, sendo substituída pelo *Schizolobium amazonicum* nesta região, mas com o primeiro aparecendo novamente mais ao norte, fato intrigante e considerado curiosíssimo (CORRÊA, 1984).

Sua utilização é recomendada na utilização como essência papeleira para reflorestamento, podendo oferecer boa matéria-prima à obtenção de

celulose para papel, por ser de fácil branqueamento e ótima resistência obtida com o papel branqueado (CORRÊA, 1985).

Apesar de toda a discussão levantada, permanecem controvérsias em torno da classificação das espécies.

Segundo trabalhos realizados no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais desta Universidade (PETKOWICZ *et al*, 1998), as sementes de *S. parahybae* e *S. amazonicum* produzem galactomananas com relação manose:galactose idêntica (3,0:1) e com semelhante distribuição de D-galactose ao longo da cadeia principal. Por outro lado, a galactomanana das sementes de *Cassia fastuosa* mostrou a mesma relação manose:galactose que as anteriores, mas sua estrutura fina revelou significativas diferenças em relação às do gênero *Schizolobium*, como mostraram as análises dos oligossacarídeos obtidos através de hidrólise ácida parcial. Os tegumentos de ambas as sementes do gênero *Schizolobium*, forneceram uma arabinana neutra linear (1→5) ligada, o que é incomum para as plantas leguminosas (ZAWADZKI-BAGGIO, 1993; PETKOWICZ, 1993). Já o tegumento das sementes de *Cassia fastuosa* (também uma Caesalpiniaceae e por isso utilizada para comparação) forneceu duas arabinanas ácidas. Estes resultados sugerem que *S. parahybae* e *S. amazonicum* constituem uma mesma espécie, considerando que galactomananas são utilizadas como marcadores taxonômicos de vegetais (HEGNAUER *et al*, 1993).

## 2.OBJETIVOS

- Analisar macroscopicamente as sementes de *Schizolobium parahybae* e *Schizolobium amazonicum*.
- Isolar as mananas do endosperma das sementes acima mencionadas.
- Determinar a composição monossacarídica das frações obtidas.
- Investigar a função das mananas nas sementes.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Extração das mananas de *S. parahybae* (guapuruvu) e *S. amazonicum* (pinho cuiabano):

As sementes inteiras de guapuruvu e pinho cuiabano foram fervidas por 30 minutos. Em seguida, foram deixadas a 4°C com água destilada para incharem, de um dia para o outro.

Após este período, o tegumento externo das sementes foi rompido, para que o endosperma fosse alcançado. Após a remoção do endosperma, os cotilédones e o embrião foram retirados e descartados. Os endospermas foram deixados em água a 4°C durante um dia para incharem.

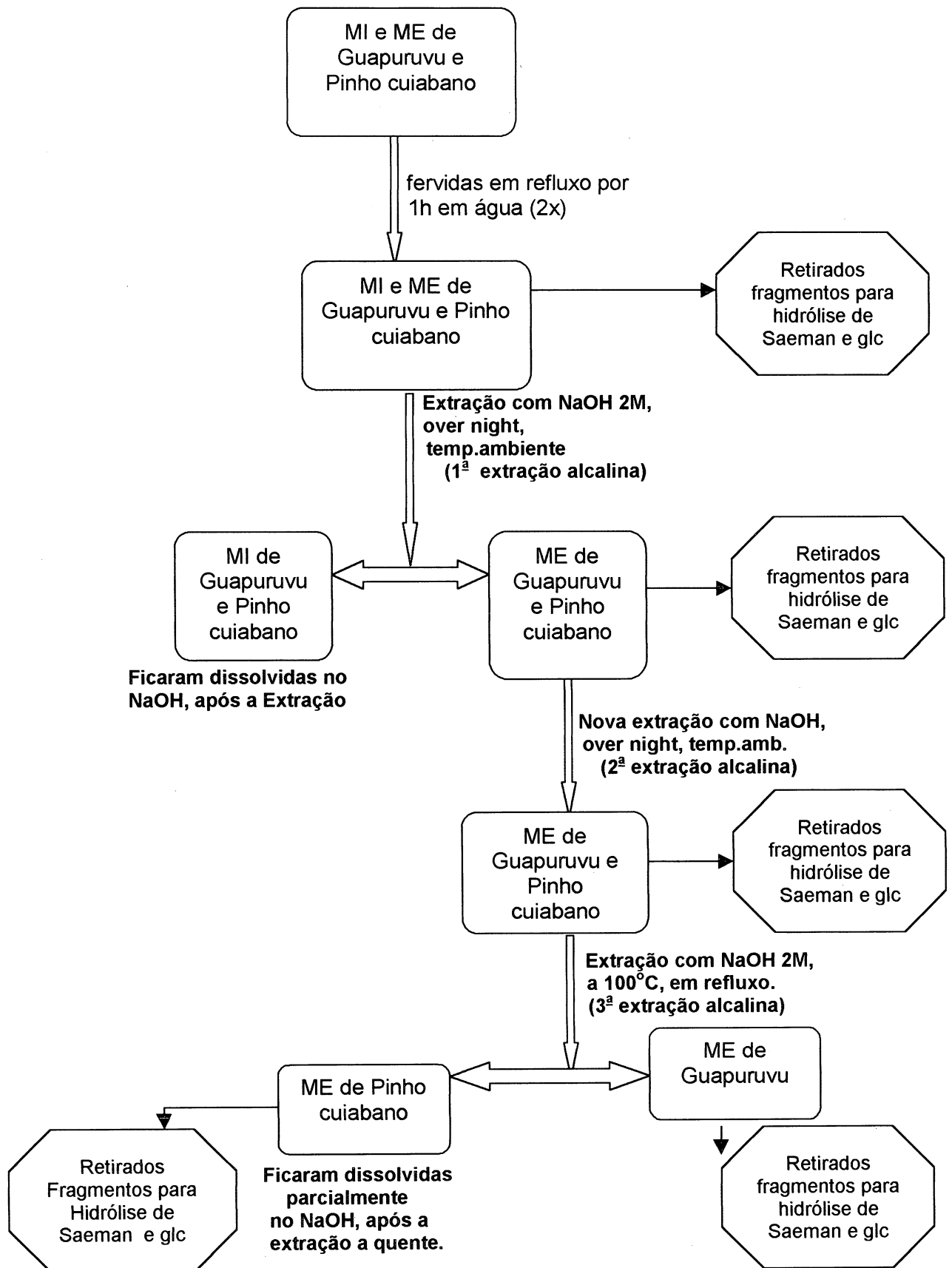
De cada espécie em separado, foram isoladas as membranas internas e externas e feitas lavagens com água destilada com o objetivo de separar todo o gel para não haver contaminação, já que este é uma galactomanana.

Após as lavagens, cada tipo de membrana foi fervida em refluxo por uma hora. Em seguida foi trocada a água de lavagem e as membranas foram submetidas a nova lavagem e fervidas por mais uma hora em refluxo. Das membranas de cada espécie, foram retirados fragmentos para execução de hidrólise de Saeman para análise em glc.

O próximo passo foi fazer extração alcalina com NaOH 2M, por 12 a 18 horas a temperatura ambiente (1ª alcalina). Logo após, nova extração alcalina com NaOH 2M, por 12 a 18 horas, a temperatura ambiente foi aplicada às membranas que resistiram à primeira extração alcalina (2ª alcalina). Novos fragmentos foram retirados para hidrólise de Saeman e glc.

Em seguida, as membranas externas de guapuruvu e pinho cuiabano foram submetidas a uma extração a 100°C com NaOH 2M, por 1 hora em refluxo (3ª alcalina) e fragmentos das membranas que resistiram a esta extração foram separados para hidrólise de Saeman e glc (ver fluxograma da página 17).

## Fluxograma de extrações de Mananas (pinho cuiabano e guapuruvu)



### 3.2 Hidrólise

Pesou-se 10 mg de cada amostra em balança analítica, que foram colocadas em tubos de hidrólise e solubilizadas em 1 ml de água destilada. Em seguida foi adicionado 1 ml de TFA (ácido trifluoracético) 2N .

As amostras permaneceram em banho-maria à temperatura de 100°C por 5 horas. Após o término deste período as amostras foram colocadas em vidros de relógio na capela para ocorrer a evaporação do ácido (que é volátil).

### 3.3 Hidrólise de Saeman

O polissacarídeo foi pré-hidrolisado adicionando-se 0,5ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 72% em banho de gelo, sob agitação por uma hora. A seguir foi feita a hidrólise, adicionando 6,7ml de água destilada, para a concentração final ficar 8% em de ácido sulfúrico e colocou-se em banho de 100°C por 5 horas. O material, então, foi neutralizado com carbonato de bário ( $BaCO_3$ ) e filtrado com ajuda de funil com algodão. Em seguida o material hidrolisado foi reduzido, acetilado e analisado por glc (procedimento usual).

Este processo deve ser aplicado quando é necessária uma hidrólise mais drástica (como no caso de mananas) ou quando o material é submetido ao processo de metilação (SAEMAN, 1954).

### 3.4 Redução

Após a hidrólise, as amostras foram transferidas para beckers depois de neutralizadas. Com as amostras já nos beckers, adicionou-se aproximadamente 10 mg de boroidreto de sódio ( $NaBH_4$ ). Depois de um período de duas horas na capela, adicionou-se resina catiônica (DOWEX 50W-X 8- $H^+$ ) com objetivo de remover os íons  $Na^+$ . Em seguida as amostras foram filtradas a vácuo para retirar a resina.



Depois de filtradas, as amostras (solubilizadas em água), foram secas em aparelho rotaevaporador. Logo após, foram feitas três lavagens com metanol (entre cada lavagem as amostras também foram secas em aparelho rotaevaporador). Estas lavagens são necessárias para extrair o borato de metila formado anteriormente.

Através deste processo, os monossacarídeos obtidos na hidrólise ácida, que antes eram constituídos de um grupo funcional aldeído, tornaram-se álcoois por causa da adição de dois átomos de hidrogênio. A partir daí, são chamados de alditóis (WOLFROM, 1963).

### **3.5 Acetilação**

Foi acrescentado às amostras reduzidas 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético. Os tubos que continham as amostras foram vedados e permaneceram por 12 a 18 horas na capela à temperatura ambiente.

A reação foi interrompida com a adição de gelo à cada amostra e junção de 2 ml de clorofórmio. Desta forma formaram-se duas fases nos tubos das amostras. A fase que contém os alditóis é a inferior (clorofórmica). Aspirou-se a fase superior (aquosa) e adicionou-se aproximadamente 3 ml de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$  5%). Foi aspirada sempre a fase superior, que é descartada. Em seguida foi adicionado aproximadamente 3 ml de água destilada. Foram feitas lavagens sucessivas com sulfato de cobre e água (em torno de seis). Depois deste processo completado, a fase inferior da amostra foi aspirada e passada para um tubo de hemólise. Assim que as amostras encontraram-se secas (clorofórmio evaporado), foram injetadas em aparelho de cromatografia líquido-gasosa (glc) (WOLFROM, 1963).

### **3.6 Cromatografia líquido gasosa (glc)**

Todos os alditóis acetatos resultantes da hidrólise, redução e acetilação dos polissacarídeos, foram analisados em cromatógrafo líquido gasoso HP 5280 II coluna capilar DB-225. Aproximadamente 0,5 $\mu$ l de cada

amostra foi injetada, em temperatura de 250°C e a fase móvel utilizada foi o gás nitrogênio.

### **3.7 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a espalhamento de luz de multiângulos (HPSEC-MALLS) e detector de índice de refração (Waters 2410)**

A cromatografia de exclusão estérica acoplada a espalhamento de luz de multiângulos foi realizada em um equipamento constituído por (no sentido do fluxo do solvente) uma bomba HPLC (Waters), filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro, injetor, 4 colunas de ultrahydrogel – 120, 250, 500 e 2000 – com limites de exclusão  $5 \cdot 10^3$ ,  $8 \cdot 10^4$ ,  $4 \cdot 10^5$  e  $7 \cdot 10^6$  respectivamente, DAWN DSP Light Scattering (Wyatt Technology) e um detector de índice de refração diferencial modelo 2410 (Waters). O solvente utilizado foi uma solução 0,1 M de Nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e 200 ppm de Azida de Sódio ( $\text{NaN}_3$ ).

a) Determinação da massa molar média ( $M_w$ ) e raio de giro.

A massa molar média ( $M_w$ ) dos polissacarídeos foi determinada através do método de espalhamento de luz. As diluições, em água ou em solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1M com  $\text{NaN}_3$  200 ppm, em concentrações de 5 mg/ml foram filtradas através de membranas de acetato de celulose (Millipore), com tamanho de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , sob pressão. Em seguida foram injetados em cromatógrafo de exclusão estérica, com detector de espalhamento laser em multiângulos, o qual permite medir a intensidade dos feixes espalhados em diferentes ângulos, e um detector de índice de refração diferencial. A injeção da amostra é feita com um volume, pelo menos, 3 vezes maior do que o necessário para preencher o “loop” do injetor de forma a evitar uma diluição no interior do mesmo. O experimento foi realizado com um fluxo de 0,6 ml/min, o que resultou numa pressão de 890 psi, a 20° C.

Os detectores de índice de refração e espalhamento de luz permitem a extrapolação gráfica da concentração e da massa molar, respectivamente.

A determinação exata dos valores é realizada através de análise informatizada eletrônica. O programa Astra (Wyatt Technology) monitora os detetores de índice de refração e espalhamento de luz, calculando os valores através das equações abaixo.

$$K^* \cdot c / R(\theta) = [1 / (M_w \cdot P(\theta))] + 2A_2 \cdot c$$

$$K^* = 4p^2 \cdot (dn/dc)^2 \cdot n_o \cdot N_A^{-1} \cdot l_o^{-4}$$

$$1 / P(\theta) = 1 + (16\pi^2 / 3\lambda^2) \cdot \langle r_g^2 \rangle \cdot \text{sen}^2(\theta/2) + \dots$$

$$\langle r_g^2 \rangle = \Sigma(r_i^2 \cdot m_i) / M$$

**R(θ)** → Função da luz espalhada, o excesso de luz espalhada pelo solvente vezes a distância entre o centro espalhador e o detetor dividido pela intensidade incidente e o volume da célula iluminada pelo laser e “visto” pelo detetor.

**P(θ)** → “função espalhamento” – mostra como a luz espalhada varia com os ângulos.

**A<sub>2</sub>** → segundo coeficiente virial. É um termo termodinâmico que mostra a interação entre o solvente e o soluto.

**c** → concentração em g/ml

**N<sub>A</sub>** → número de Avogadro

**l<sub>o</sub>** → comprimento de onda da luz incidente no vácuo

**dn/dc** → variação do índice de refração da solução do material analisado com a variação de sua concentração

**⟨r<sub>g</sub><sup>2</sup>⟩** → é o raio médio, relativo a distribuição de massa da molécula.

Para a determinação correta da massa molar, foi necessário a determinação do dn/dc (variação do índice de refração da solução do material analisado com a variação de sua concentração), pois verificamos sua influência quadrática nas equações mencionadas acima.

#### b) Determinação do $dn/dc$ .

Para cada amostra foi determinado com a injeção seqüencial de 5 (cinco) concentrações diferentes e crescentes de 0,2 g/l, 0,4 g/l, 0,6 g/l, 0,8 g/l e 1,0 g/l em uma configuração diferente do equipamento, onde a amostra não passa pelas colunas e pelo DAWN DSP de forma a possibilitar uma filtração em membranas de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

A determinação exata dos valores é realizada através de análise informatizada eletrônica. O programa Astra (Wyatt Technology) monitora os detetores de índice de refração e espalhamento de luz, sendo que para esta análise é necessário a informação correta da massa injetada, já que deve-se assumir 100% de massa recuperada, razão pela qual limita-se a filtração em 0,45  $\mu\text{m}$  e a utilização apenas do detetor de índice de refração.

O cálculo do  $dn/dc$  foi realizado com as frações gel de  $T_0$  e  $T_5$  e os valores obtidos foram 0,127 e 0,169, respectivamente.

### **3.8 Estudos macroscópicos das sementes de *S. parahybae* e *S. amazonicum***

Foram feitas fotografias das sementes de *S. parahybae* e *S. amazonicum* visualizando suas diferentes partes componentes. Para isso, as sementes foram abertas manualmente e suas partes separadas foram dispostas em placas de petri e fotografadas.

### **3.9 Germinação das sementes de *Schizolobium parahybae* e *Schizolobium amazonicum***

As sementes foram lavadas com água destilada, desinfetadas com hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e lavadas novamente com água destilada para retirar os resíduos.

Em seguida, foram inchadas mergulhando-as em H<sub>2</sub>O recém fervida, onde foram deixadas por 24 horas à temperatura ambiente. Após este período, as sementes que já estavam inchadas foram plantadas em cubas plásticas (40 cm de comprimento x 26 cm de largura e 7,3 cm de altura) contendo vermiculita autoclavada com aproximadamente 6 cm de altura.

As sementes que ainda não estavam inchadas, foram colocadas em banho-maria a 45°C até que se encontraram hidratadas o suficiente para que pudesse ser feito o plantio.

As cubas foram colocadas na sala de cultivo do Departamento de Bioquímica, onde a temperatura variava entre 22 e 24°C e o fotoperíodo era de 12 horas. O substrato foi umidificado a cada 24 horas.

Após a abertura do tegumento e desenvolvimento do embrião, foram analisadas as membranas e o gel do endosperma das sementes.

### **3.10 Autoclavagem da vermiculita**

A vermiculita (substrato utilizado para a germinação) foi acondicionada em sacos plásticos domésticos resistentes a freezer e microondas, formando pacotes. Cada pacote continha 5 sacos plásticos sobrepostos, com o objetivo de evitar vazamentos no interior da autoclave. Desta forma 8 Kg de vermiculita foram autoclavados por 20 minutos.

### **3.11 Preparação das sementes germinadas para análise**

As sementes para análise foram retiradas diariamente após a germinação. Desta forma a denominação das frações foi:

- T<sub>0</sub>: sementes inchadas, antes do plantio;
- T<sub>1</sub>: sementes retiradas no primeiro dia de germinação;
- T<sub>2</sub>: sementes retiradas no segundo dia de germinação;
- T<sub>3</sub>: sementes retiradas no terceiro dia de germinação;
- T<sub>4</sub>: sementes retiradas no quarto dia de germinação;
- T<sub>5</sub>: sementes retiradas no quinto dia de germinação;
- T<sub>6</sub>: sementes retiradas no sexto dia de germinação;

- T<sub>10</sub>: sementes retiradas no décimo dia de germinação;
- T<sub>12</sub>: sementes retiradas no décimo segundo dia de germinação.

Em cada tempo, a semente foi coletada, o tegumento foi aberto e o endosperma retirado. Manualmente foi feita a separação do endosperma em membrana interna, membrana externa e gel. As partes foram colocadas separadamente em béckers onde foi colocado água destilada fervente. Em seguida, os béckers com cada amostra foram colocados em forno microondas por 2 minutos, para inativação enzimática.

Após a inativação, as membranas internas e externas passaram por um processo manual de lavagem com água destilada, para retirar possíveis contaminações com o gel de galactomanana.

Em seguida, as membranas foram colocadas em placas de petri e secas em estufa à vácuo, preparando-as desta forma para a hidrólise de Saeman. Porém antes da hidrólise, todas as frações foram pesadas, para acompanhar um possível consumo das moléculas durante a germinação.

Os géis não passaram pelo processo de lavagem, já que são solúveis em água. Foram secos em estufa à vácuo e, da mesma forma que as membranas, foram pesados.

Após a pesagem, os géis foram novamente solubilizados em água e então centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi precipitado com 3 volumes de etanol e deixado "over night" em geladeira. Em seguida este precipitado foi centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos e colocado para secar em estufa à vácuo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração de mananas

Ao examinar as sementes inchadas com água, observou-se que as sementes de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu) e *Schizolobium amazonicum* (pinho cuiabano) são muito parecidas, diferindo apenas no tamanho e conseqüentemente, na espessura das estruturas componentes do endosperma de cada uma.

Mais especificamente, o endosperma das duas espécies citadas acima, é composto por uma membrana mais espessa, que fica externa, em contato com o tegumento (ME) da semente e uma membrana delgada, interna, que fica em contato com o embrião (MI). Como o embrião é a estrutura mais interna, existe um conjunto como o descrito anteriormente de cada lado do embrião. Portanto, em cada semente existem dois destes conjuntos (unidades).

Ao separar a membrana interna da externa de cada unidade, percebeu-se que elas envolvem uma quantidade relativamente grande de um gel transparente e inodoro, formado por galactomananas (PETKOWICZ, 1998). Isso acontece tanto para as sementes de guapuruvu quanto para as de pinho cuiabano (ver figuras do item Análise macroscópica das sementes de *S. parahybae* e *S. amazonicum*).

As membranas de pinho cuiabano já foram estudadas anteriormente pelo laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica da UFPR (PETKOWICZ, 1998) e havia sido encontrada uma manana em sua composição. O gel das duas espécies é composto por galactomananas. A composição das membranas externas e internas foi analisada comparativamente em ambas espécies.

Após a primeira extração alcalina (NaOH 2M) "over night", temperatura ambiente (ver fluxograma) foram retirados fragmentos somente das membranas externas de guapuruvu e pinho cuiabano para hidrólise de Saeman e glc, pois estas se mostraram resistentes. As membranas internas não

puderam ser analisadas, pois foram dissolvidas pelo NaOH 2M e apenas os resíduos de extração foram separados para análise.

Após a extração com NaOH 2M a 100°C, as membranas externas de pinho cuiabano ficaram dissolvidas. Apenas as membranas externas de guapuruvu resistiram à extração e fragmentos delas foram retirados para hidrólise de Saeman e glc. Os pequenos fragmentos das membranas externas de pinho cuiabano resultantes da extração alcalina à quente também foram submetidos a esta análise.

Serão apresentadas primeiramente os resultados obtidos para *S. parahybae* e na seqüência *S. amazonicum*.

#### 4.1.1 *S. parahybae*

Através da análise das membranas do endosperma desta espécie, foram detectadas as composições monossacarídicas, depois da hidrólise de Saeman, redução, acetilação e análise por glc, que estão demonstradas na tabela I:

TABELA I. Composição monossacarídica das membranas do endosperma da espécie *S. parahybae*:

Monossacarídeo	Porcentagens (%)				
	Ext. aquosa <sup>a</sup>		1 <sup>a</sup> alcalina <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup> alcalina <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup> alcalina <sup>a</sup>
	ME	MI	ME	ME	ME
Arabinose	5,88	7,72	6,64	4,44	nd
Manose	86,90	72,58	86,70	85,75	97,31
Galactose	5,87	18,58	6,66	8,64	2,69
Glucose	1,35	1,11	nd <sup>c</sup>	1,18	nd

<sup>a</sup> Refluxo (100°C)

<sup>b</sup> Temperatura ambiente

<sup>c</sup> não detectável

Como foi descrito no fluxograma de extração para esta espécie, as membranas internas (que são mais delgadas, finas), resistiram apenas às extrações aquosas e não às extrações alcalinas e em decorrência deste fato,



não constam as membranas internas (MI) das extrações alcalinas na Tabela I apresentada acima.

Como podemos observar na Tabela, as membranas externas e internas apresentam diferenças na quantidade de monossacarídeos, especialmente tratando-se de manose e galactose. As ME apresentam quantidade maior de manose do que as MI, confirmando a diferença estrutural entre as duas.

#### 4.1.2 *S. amazonicum*:

Como resultado das análises para esta espécie, encontramos a composição monossacarídica e correspondentes porcentagens, apresentadas na Tabela II.

TABELA II. Composição monossacarídica das membranas do endosperma de *S. amazonicum*:

Monossacarídeo	Porcentagens (%)				
	Ext. aquosa <sup>a</sup>		1 <sup>a</sup> alcalina <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup> alcalina <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup> alcalina <sup>a</sup>
	ME	MI	ME	ME	ME
Arabinose	2,64	5,70	2,51	2,49	nd
Manose	87,76	69,89	90,55	87,21	97,70
Galactose	8,74	21,84	6,94	9,06	1,86
Glucose	1,03	2,56	nd <sup>c</sup>	1,24	0,44

<sup>a</sup> Refluxo (100°C)      <sup>b</sup> Temperatura ambiente      <sup>c</sup> não detectável

Da mesma forma que para a espécie anterior, nesta as membranas internas resistiram apenas à extração aquosa.

Aqui as membranas externas e internas também apresentaram uma diferença na porcentagem da composição monossacarídica. Novamente as membranas externas (mais espessas) são mais ricas em manose, confirmando novamente a diferença entre elas.

As extrações alcalinas revelaram uma quantidade relativamente constante de cada monossacarídeo, uma em relação à outra.

#### 4.1.3 Análise comparativa das espécies *S. parahybae* e *S. amazonicum*

Primeiramente, analisamos através da Tabela III, as extrações aquosas das membranas externas e internas das duas.

TABELA III. Análise comparativa dos resultados das Tabelas I e II. Composição monossacarídica das frações obtidas do resíduo proveniente das extrações aquosas das membranas de *S. parahybae* e *S. amazonicum*.

Monossacarídeo	Porcentagens (%)			
	<i>S. parahybae</i>		<i>S. amazonicum</i>	
	ME	MI	ME	MI
Arabinose	5,88	7,72	2,64	5,70
Manose	86,90	72,58	87,76	69,89
Galactose	5,87	18,58	8,74	21,84
Glucose	1,35	1,11	1,03	2,56

Observamos que a porcentagem do monossacarídeo presente em maior quantidade (a manose) é muito semelhante para as membranas externas (*S. parahybae*: 86,90% e *S. amazonicum*: 87,76%). O mesmo ocorre para as membranas internas (*S. parahybae*: 72,58% e *S. amazonicum*: 69,89%).

Isto pode ser um indicativo da semelhança estrutural das mananas das duas espécies, da mesma forma que ocorre para as suas galactomananas e arabinanas, conforme foi discutido na introdução.

Para as extrações alcalinas, com NaOH 2M (ver fluxograma) os dados estão contidos na Tabela comparativa IV.

TABELA IV. Análise comparativa dos resultados das Tabelas I e II. Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações alcalinas das membranas externas de *S. parahybae* e *S. amazonicum*.

Monossa- carídeo	Porcentagens (%)					
	S.	S.	S.	<i>S. ama-</i>	<i>S. ama-</i>	<i>S. ama-</i>
	<i>parahybae</i>	<i>parahybae</i>	<i>parahybae</i>	<i>zonicum</i>	<i>zonicum</i>	<i>zonicum</i>
	1 <sup>a</sup> alcalina	2 <sup>a</sup> alcalina	3 <sup>a</sup> alcalina	1 <sup>a</sup> alcalina	2 <sup>a</sup> alcalina	3 <sup>a</sup> alcalina
Arabinose	6,64	4,44	nd	2,51	2,49	nd
Manose	86,70	85,75	97,31	90,55	87,21	97,70
Galactose	6,66	8,64	2,69	6,94	9,06	1,86
Glucose	nd*	1,18	nd	nd	1,24	0,44

\* não determinado

Através da comparação das duas espécies, podemos observar que as porcentagens para a manose e galactose, que são os monossacarídeos presentes em maior quantidade, são também muito parecidas.

Com a análise destes dados, juntamente com o conhecimento dos resultados dos trabalhos já realizados (citados anteriormente) confirmamos a presença de uma manana também no *S. parahybae* (guapuruvu).

As fotografias que mostram a anatomia das sementes são mostradas a seguir.

#### 4.2 Aspectos macroscópicos das sementes de *S. parahybae* e *S. amazonicum*

As figuras abaixo expostas, mostram as sementes de *S. parahybae* e *S. amazonicum* inteiras e abertas, com suas partes componentes.

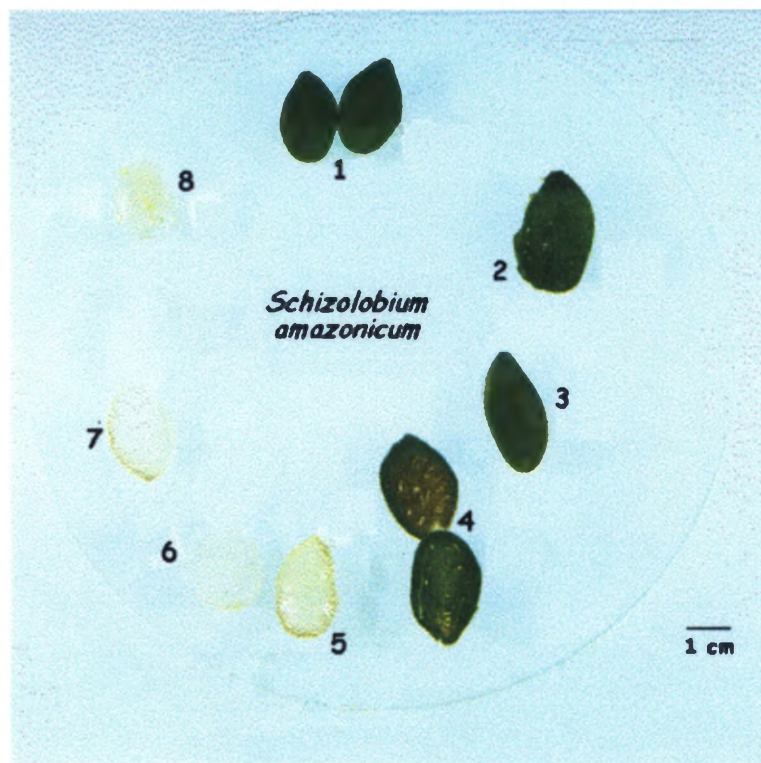


FIGURA 2 – Visão geral das sementes de *S. amazonicum*, mostrando todas as suas partes isoladas. 1. Sementes inteiras; 2. Semente após entumescimento; 3. Semente após inchamento com o tegumento externo removido; 4. Corte longitudinal, mostrando o endosperma e cotilédones; 5. Endosperma isolado; 6 e 7. Endosperma aberto e com o gel de galactomanana removido, mostrando as membranas internas (superiores) e externas (inferiores) compostas por mananas; 8. Gel isolado.

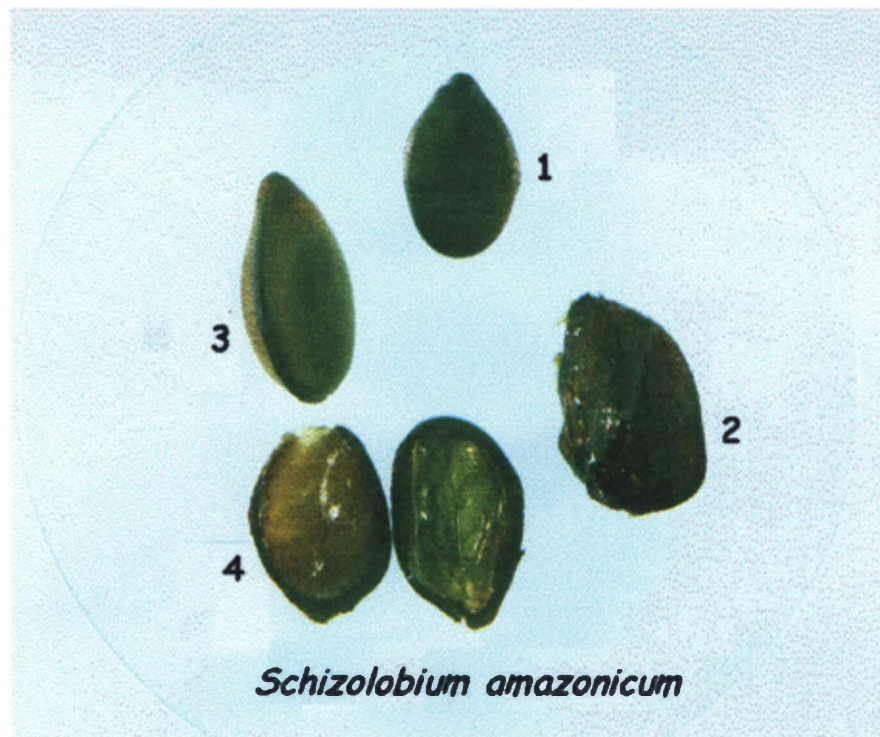


FIGURA 3 – Sementes de *S. amazonicum*. 1. Semente inteira; 2. Semente após entumescimento, com tegumento externo parcialmente removido; 3. Semente após entumescimento com o tegumento externo totalmente removido; 4. Semente em corte longitudinal, mostrando o endosperma e cotilédones.

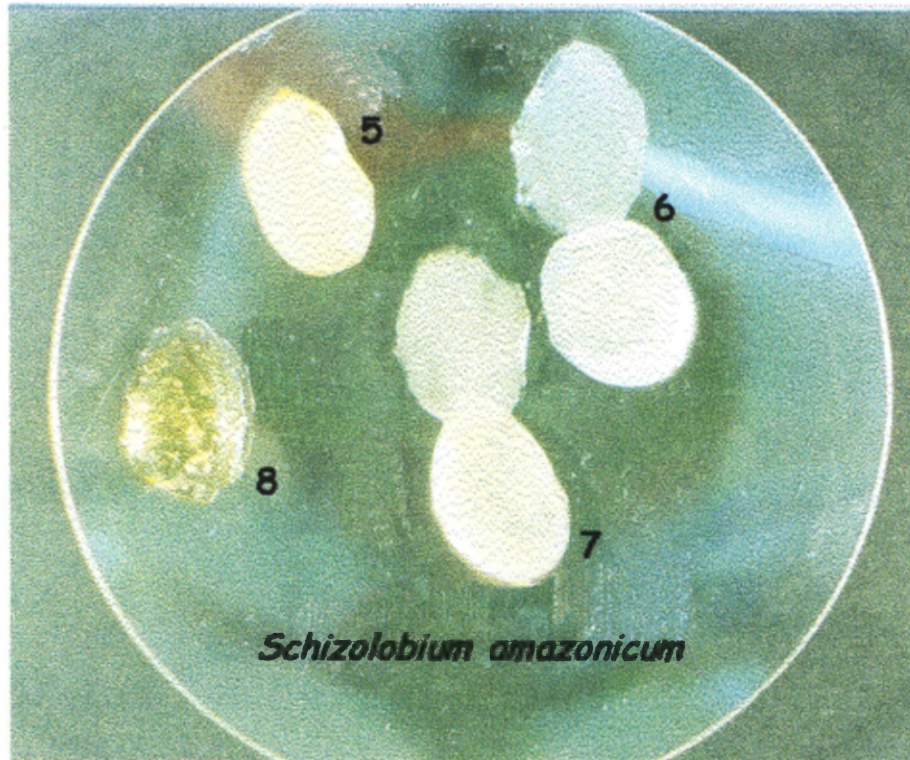


FIGURA 4 – Sementes de *S. amazonicum*, mostrando seu endosperma, suas membranas isoladas e gel. 5. Endosperma isolado da semente; 6 e 7. Endosperma aberto e com o gel de galactomanana removido, mostrando as membranas internas (superiores) e externas (inferiores) compostas por mananas; 8. Gel isolado.

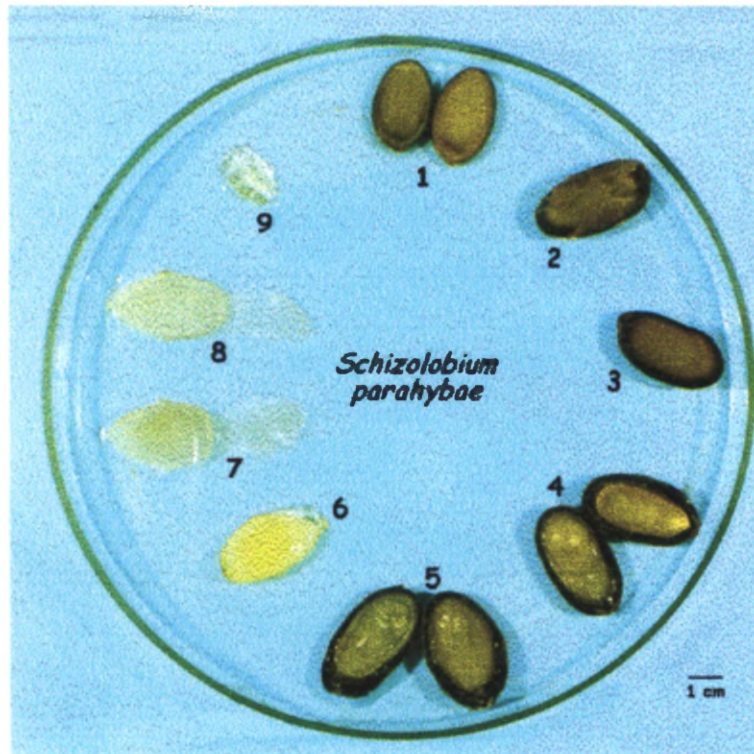


FIGURA 5 – Visão geral das sementes de *S. parahybae*, mostrando todas as suas partes isoladas. 1. Sementes inteiras; 2. Semente após entumescimento; 3. Semente após entumescimento com o tegumento externo removido; 4. Semente aberta ao meio, mostrando o endosperma e cotilédones; 5. Semente em corte longitudinal mostrando apenas o endosperma, após a remoção dos cotilédones e embrião; 6. Endosperma isolado; 7 e 8. Endosperma aberto e com o gel de galactomanana removido, mostrando as membranas internas (à direita) e externas (à esquerda) compostas por mananas; 9. Gel isolado.

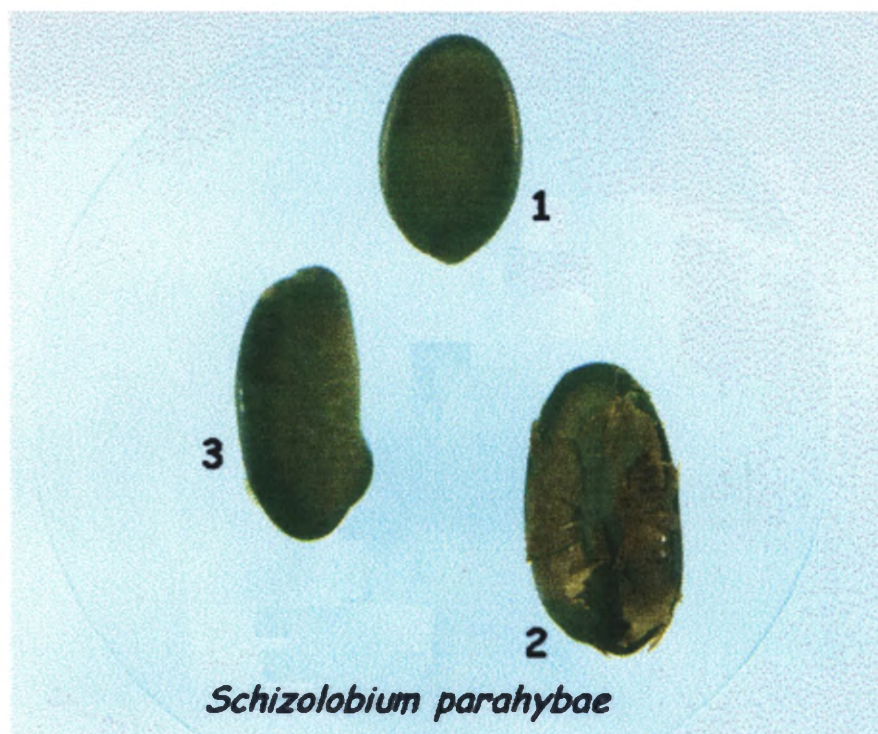


FIGURA 6 – Sementes inteiras de *S. parahyae*. 1. Semente inteira; 2. Semente após entumescimento, com o tegumento externo parcialmente removido; 3. Semente após entumescimento com o tegumento externo totalmente removido.



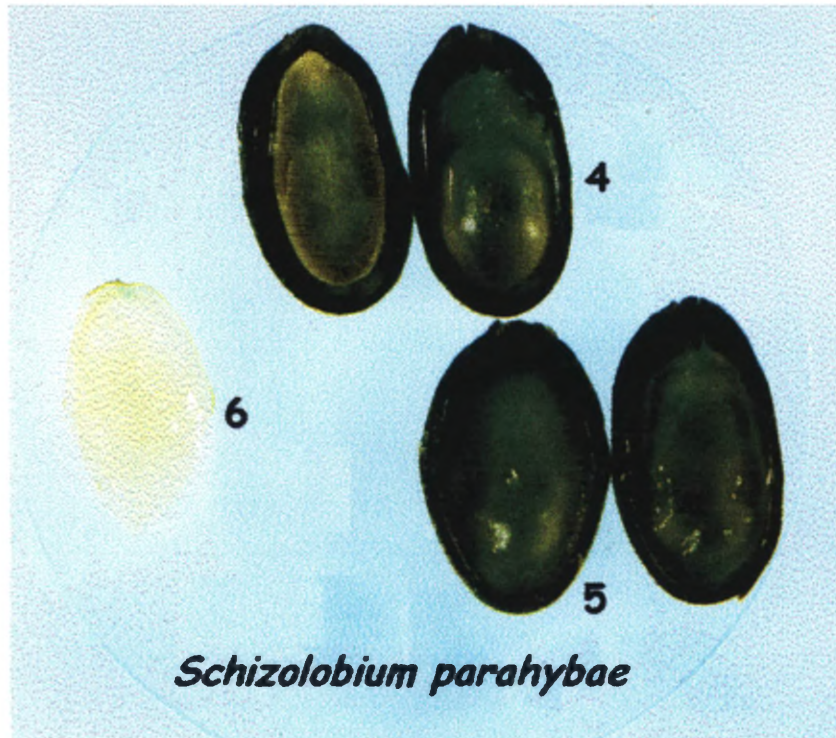


FIGURA 7 – Sementes abertas de *S. parahyae*. 4. Semente em corte longitudinal, mostrando o endosperma e cotilédones com embrião; 5. Semente em corte longitudinal mostrando apenas o endosperma, após a remoção dos cotilédones e embrião; 6. Endosperma isolado.



FIGURA 8 – Sementes de *S. parahybae*, mostrando suas membranas isoladas e gel. 7 e 8. Endosperma aberto e com o gel de galactomanana removido, mostrando as membranas internas (inferiores) e externas (superiores) compostas por mananas; 9. Gel isolado.

Através destas figuras da anatomia das sementes do gênero *Schizolobium*, podemos observar com precisão onde estão localizadas as mananas isoladas e caracterizadas neste trabalho, bem como as galactomananas. A manana verdadeira anteriormente referida, foi extraída da membrana externa do endosperma das sementes e as galactomananas, do gel isolado da parte interior do endosperma.

Para a compreensão da função destas mananas na semente, foram realizados os experimentos de germinação com as duas espécies do gênero *Schizolobium*, que são relatados e discutidos a seguir.

### 4.3 Germinação de *S. parahybae* e *S. amazonicum*

#### 4.3.1 Experimento 1

Foi feito um experimento preliminar de germinação, onde foram utilizadas tanto *S. parahybae* quanto *S. amazonicum* para determinar as condições do experimento e verificar possíveis diferenças de comportamento entre as duas espécies.

As sementes foram germinadas nas próprias instalações do Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais à temperatura ambiente. Elas foram submetidas ao tratamento de desinfecção com uso de hipoclorito de sódio 1%, mas apesar disso houve um alto índice de contaminação por fungos.

A quebra de dormência das sementes foi feita submergindo-as em água destilada recém fervida. Elas foram deixadas nesta água por 24 horas para que inchassem. Porém, a maioria das sementes necessitava de um tempo maior para encontrar-se apta para o plantio. Então, após a troca da água, elas foram deixadas em banho-maria a 45°C até alcançar um grau de hidratação adequado. Isto era avaliado visualmente através da espessura das sementes. Quando esta espessura encontrava-se aproximadamente triplicada, a semente era considerada pronta para o plantio.

Foram separadas 50 sementes de cada espécie, que foram plantadas em cubas plásticas. Cada cuba comportou 25 sementes com espaçamento aproximado entre elas de 5 cm. O substrato (vermiculita) foi mantido umidificado com água destilada constantemente para evitar o ressecamento das sementes.

A germinação iniciou 12 dias após o plantio das sementes. Neste momento o tegumento rompeu-se e radícula pode ser visualizada. O tegumento abriu-se gradativamente até haver a liberação dos dois cotilédones. Entre eles há a formação dos folículos e a diferenciação de um caule, originando uma plântula (planta jovem). Neste estágio o tegumento foi totalmente liberado e então as membranas do endosperma puderam ser analisadas. Do primeiro dia da germinação até a formação da plântula houve

um período de aproximadamente 20 dias, existindo alguma variação de semente para semente.

O tegumento foi aberto e separado em duas partes, porém as membranas do endosperma compostas de manana não foram visualizadas, pois encontravam-se intimamente unidas às paredes internas do tegumento. Então foram mergulhadas em água destilada e, após aproximadamente 12 horas, pode-se verificar a presença tanto da membrana externa quanto da interna, que puderam ser separadas. A presença das membranas levou à indicação que durante a germinação apenas a galactomanana (gel) presente no endosperma foi consumida e as membranas que contém o gel (também componentes do endosperma) possuem função estrutural.

A partir deste experimento preliminar, foi verificada a necessidade de acompanhar o consumo diário de galactomananas pela semente desde a germinação até o ponto onde estas moléculas não estão mais presentes e confirmar o não consumo das mananas do endosperma. Para isso, decidiu-se organizar um novo experimento de germinação, partindo-se de um número maior de sementes e realizando-o na sala de cultivo do Departamento de Bioquímica, onde a temperatura e luminosidade são controladas.

Decidiu-se utilizar apenas as sementes *S. parahybae* espécie para o novo experimento, já que suas sementes são maiores e pelo acesso facilitado a novas sementes, adquiridas na EMBRAPA Florestas, localizada em Colombo, Paraná.

#### **4.3.2 Experimento 2**

O objetivo deste experimento era acompanhar diariamente o consumo das galactomananas. Para isso foram estabelecidos tempos de germinação como parâmetros de análise. O  $T_0$  seria a semente inchada, pronta para o plantio. O  $T_1$  seria o primeiro dia da germinação, o  $T_2$  o segundo e assim sucessivamente. Desta forma foi possível determinar o dia exato em que toda a galactomanana foi consumida.

Foram separadas 300 sementes de *S. parahybae* e preparadas como já descrito anteriormente. Elas foram distribuídas em 12 cubas iguais (ver tamanho e disposição das sementes no item anterior).

Durante o inchamento das sementes precedente ao plantio, algumas atingem o estágio necessário antes das outras. Por isso o plantio foi feito em várias etapas. Na primeira etapa foram plantadas 50 sementes que primeiro atingiram as condições desejadas, distribuídas em duas cubas.

As sementes foram plantadas de modo a facilitar a germinação, colocando-se a região do hilo e micrópila voltada para baixo, enterrada no substrato. É nesta região que o tegumento sofre a primeira abertura para a saída da radícula.

As primeiras sementes a germinar foram as das cubas 1 e 2, que foram as primeiras a atingirem o estágio necessário para o plantio.

Por causa da posição da semente, o momento da germinação não foi visualizado e o dia não foi marcado. Como o objetivo do experimento era acompanhar diariamente o consumo das galactomananas, ele não cumpriu o propósito, já que o dia exato da germinação não foi determinado.

Então as duas primeiras cubas foram descartadas e o experimento teve continuidade. Porém, uma quantidade muito reduzida das sementes das outras 10 cubas germinaram e foram insuficientes para a conclusão do experimento. Considerando as sementes germinadas nas duas primeiras cubas, a taxa de germinação foi de 11%.

Entretanto um resultado importante foi detectado a partir do acima exposto. As sementes mais viáveis e propensas a germinar são aquelas que primeiro atingem o estado de hidratação considerado suficiente para o plantio.

A partir deste fato, um terceiro experimento foi iniciado. Porém neste, foram utilizadas apenas as primeiras sementes aptas ao plantio, completando duas cubas (50 sementes).

### 4.3.3 Experimento 3

No terceiro e último experimento de germinação, partiu-se de 240 sementes e após o procedimento usual (inchamento das sementes), apenas as primeiras 50 sementes que atingiram o estágio ideal para germinação foram plantadas. As outras foram descartadas. Com esta modificação, a taxa de germinação passou de 11% no experimento anterior para 34% neste, considerando somente as sementes plantadas. As sementes germinadas foram suficientes para a realização de todas as análises.

Neste experimento a região do hilo e micrópila das sementes foram colocadas voltadas para cima, exteriores em relação ao substrato. Isto permitiu o acompanhamento do dia exato da germinação de cada semente. Para um controle mais rigoroso, ao lado de cada semente, foi colocado uma bandeira com a data da germinação.

Após o procedimento descrito no item Materiais e Métodos, as análises foram realizadas e discutidas a seguir.

Através da pesagem das amostras, foi feito um acompanhamento da diminuição de cada fração de acordo com os tempos de germinação. Os resultados estão expostos na Tabela V.

TABELA V - Massa (em gramas) das membranas externas e internas e géis de *S. parahybae* após germinação

	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>12</sub>
MI	0,053	0,035	0,027	0,014	0,009	0,008	0,006	0,012	0,012
ME	0,197	0,197	0,190	0,114	0,140	0,058	0,012	0,059	0,057
Gel	0,168	0,158	0,093	0,119	0,070	0,034	nd*	nd	nd

\*não detectável

Observa-se que enquanto o gel T<sub>5</sub> foi totalmente consumido, as membranas em T<sub>12</sub> representam aproximadamente 30% da massa original. A análise por glc das membranas (Tabelas III e IV) mostra que somente a ME em T<sub>12</sub> consiste em uma manana pura.

Foi visível a diminuição na espessura das membranas à medida que os embriões desenvolviam-se. Através disso, podemos supor que as regiões das membranas que ficam em contato com o gel e não são formadas por mananas puras também sofrem ação enzimática durante a germinação.

As membranas internas e externas retiradas em cada tempo de germinação foram analisadas por glc. O tipo de hidrólise utilizado foi o de Saeman. A composição monossacarídica encontrada nestas análises encontram-se nas tabelas VI e VII.

TABELA VI – Composição monossacarídica (em %) das membranas internas das sementes de *S. parahybae* nos vários tempos de germinação.

Monos-sacarídeo	Frações MI (%)								
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>12</sub>
Ara	3,2	4,0	5,0	10,0	11,4	10,2	14,7	8,1	12,9
Xil	1,8	1,8	2,2	4,4	8,7	6,8	24,5	11,1	12,4
Man	<b>66,7</b>	<b>68,1</b>	<b>64,8</b>	<b>61,8</b>	<b>58,6</b>	<b>66,6</b>	<b>26,5</b>	<b>48,1</b>	<b>56,6</b>
Gal	<b>26,9</b>	<b>26,2</b>	<b>28,1</b>	<b>21,1</b>	<b>17,6</b>	<b>13,4</b>	<b>24,2</b>	<b>23,3</b>	<b>14,8</b>
Glc	1,3	-	-	2,6	3,8	3,1	10,1	9,3	3,5

É possível verificar na tabela VI que as porcentagens de manose em cada fração se mantiveram próximas do primeiro dia de germinação até o último dia analisado, exceto em T<sub>6</sub>. A porcentagem encontrada em T<sub>6</sub> pode ser justificada, pois justamente neste tempo o gel não podia mais ser separado das membranas, mas ainda estava presente em pequena quantidade, ocorrendo uma contaminação com a galactomanana nesta fração.

TABELA VII – Composição monossacarídica (em %) das membranas externas das sementes de *S. parahybae* nos vários tempos de germinação.

Monos-sacarídeo	Frações ME (%)								
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>12</sub>
Ara	4,5	7,7	6,3	8,5	5,8	5,5	20,0	10,5	6,8
Xil	-	-	0,7	1,7	0,9	1,3	9,1	4,9	3,7
Man	<b>85,1</b>	<b>83,7</b>	<b>83,3</b>	<b>80,7</b>	<b>85,2</b>	<b>84,9</b>	<b>59,2</b>	<b>74,3</b>	<b>84,3</b>
Gal	<b>6,1</b>	<b>8,5</b>	<b>8,1</b>	<b>7,2</b>	<b>6,1</b>	<b>7,1</b>	<b>6,7</b>	<b>6,8</b>	<b>3,2</b>
Glc	1,7	-	1,5	1,9	1,9	1,3	4,9	3,5	2,0

Nesta tabela, onde os dados das membranas externas são apresentados, também observamos quantidades aproximadamente constantes de manose nas frações. Entretanto as quantidades de galactose variam de 8,5% para 3,2%. Aqui, da mesma forma que para as membranas internas, em T<sub>6</sub> a quantidade de manose é menor em relação às demais frações. A explicação pode ser considerada a mesma das membranas internas.

As quantidades de arabinose e xilose presentes nas amostras provavelmente são oriundas do tegumento da semente, já que quanto mais tempo de germinação a semente possui, mais dificultada torna-se a retirada das membranas, pois estas apresentam-se mais intimamente unidas à parte interna do tegumento. Considerando esta possibilidade, a Tabela VIII relaciona somente o conteúdo de manose e galactose das frações.



TABELA VIII – Composição monossacarídica (em %) das membranas externas das sementes de *S. parahybae* nos vários tempos de germinação, considerando apenas os conteúdos de manose e galactose.

Monos-sacarídeo	Frações (%)								
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>12</sub>
Man	93,4	90,8	91,2	91,8	93,3	92,3	89,8	91,6	96,3
Gal	6,6	9,2	8,8	8,2	6,7	7,7	10,2	8,4	3,7
Man: Gal*	14,2:1	9,7:1	10,4:1	11,2:1	13,9:1	12,0:1	8,8:1	10,9:1	26,0:1

\*Relação manose:galactose

Como podemos observar na Tabela VIII, altas quantidades de manose são encontradas em todas as frações, sendo que a relação Man:Gal de T<sub>0</sub> a T<sub>10</sub> varia entre 10:1 e 14:1. A fração T<sub>12</sub> apresentou uma relação manose:galactose de 26:1, indicando a presença de uma manana verdadeira, já que possui mais de 95% de manose (STEPHEN, 1983). É importante lembrar que a manana pura na semente não germinada só foi obtida após extrações drásticas de ME com NaOH 2M, em refluxo. Este resultado consistiu em mais um indicativo de que as mananas não são consumidas pelo embrião durante a germinação, possuindo portanto função estrutural.

Os resultados apresentados sugerem que a manana de *S. parahybae* possui função estrutural, diferente daquela de *Phytelephas macrocarpa*, conhecida como “ivory nut”.

#### **Análise dos géis de galactomanana das sementes nos diferentes tempos de germinação em *S. parahybae***

Os géis foram solubilizados, precipitados e analisados por glc e os resultados foram expostos na tabela IX abaixo.

TABELA IX - Composição monossacarídica (em %) dos géis de *S. parahybae* após a germinação das sementes.

Monossacarídeo	Géis (%)					
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
Manose	71,8	71,6	74,1	73,2	71,7	75,2
Galactose	26,2	27,1	25,9	26,8	27,2	23,7
Glucose	2,03	1,3	-	-	1,1	1,1
Man:Gal	2,7:1	2,6:1	2,8:1	2,7:1	2,6:1	3,1:1

Na Tabela IX, podemos observar que a proporção manose:galactose das frações permaneceu relativamente constante.

Os géis coletados nos diferentes tempos de germinação também foram analisados por HPSEC-MALLS, para verificar a homogeneidade das amostras, procurando uma visualização gráfica da quebra das moléculas pela ação enzimática, pois teoricamente as enzimas quebrariam as moléculas de galactomanana ainda no endosperma e posteriormente as moléculas menores resultantes seriam transportadas aos cotilédones e passadas às regiões de crescimento do embrião (RAVEN, 1996).

Os gráficos resultantes das análises foram mostrados nas figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

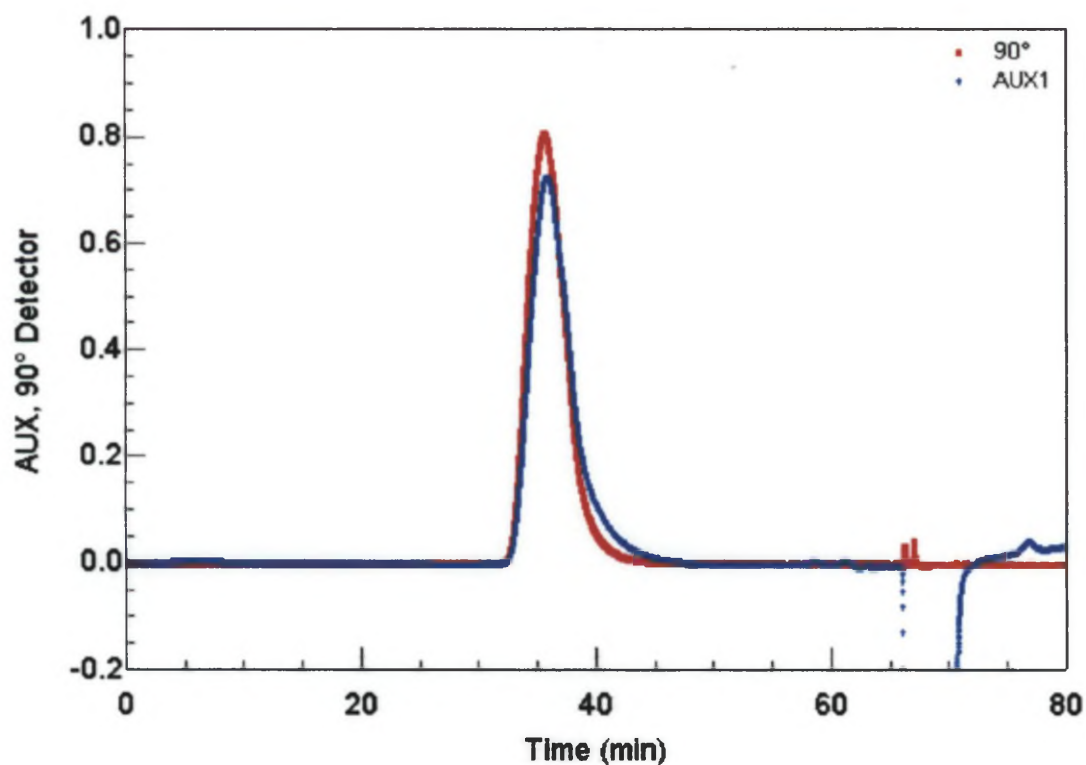


FIGURA 9 – Teste de homogeneidade realizado com o gel T<sub>0</sub>, por HPSEC-MALLS. (AUX. – detector diferencial de índice de refração; 90° – Detector de espalhamento de luz em um ângulo de 90°)

Através do gráfico apresentado na Figura 9, podemos verificar que a amostra é homogênea, apresentando apenas um tipo de molécula. Elas não sofreram ação enzimática antes da germinação .

A massa ponderal média obtida para esta fração através do cálculo de  $dn/dc$ , foi de 1.057.000.

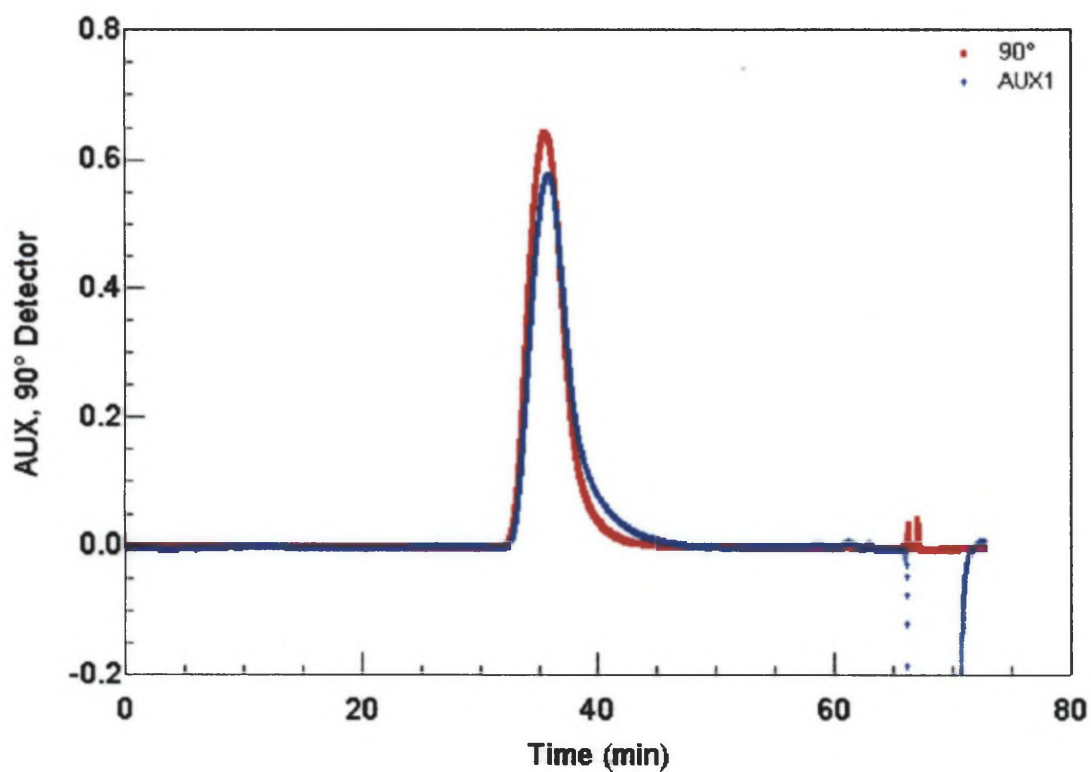


FIGURA 10 – Teste de homogeneidade realizado com o gel T<sub>1</sub>, por HPSEC-MALLS. (AUX. – detector diferencial de índice de refração; 90° – Detector de espalhamento de luz em um ângulo de 90°)

Da mesma forma que na figura anterior (9), podemos visualizar um gráfico indicando uma amostra homogênea, apresentando o mesmo volume de eluição e portanto a mesma massa molar média ( $M_w$ ).

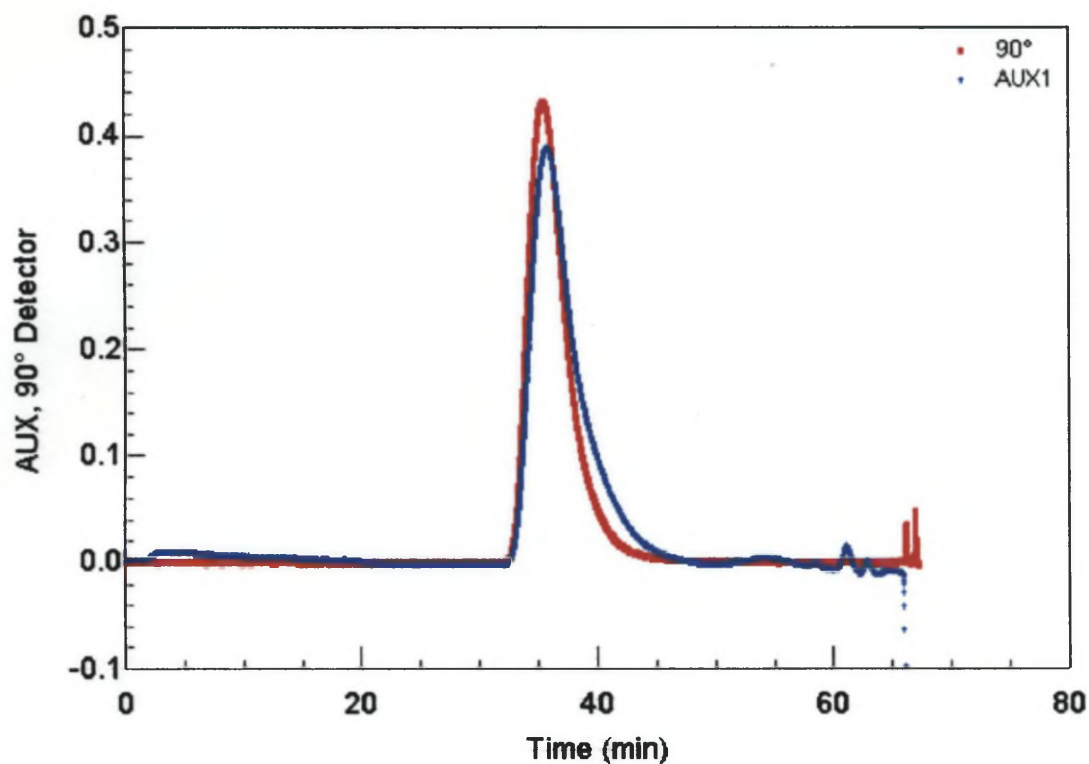


FIGURA 11 – Teste de homogeneidade realizado com o gel T<sub>3</sub>, por HPSEC-MALLS. (AUX. – detector diferencial de índice de refração; 90° – Detector de espalhamento de luz em um ângulo de 90°)

Pela análise do gráfico, a fração T<sub>3</sub> também apresentou um perfil homogêneo. Esta fração obteve o mesmo tempo de eluição que T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> e por isso a massa molar média é a mesma das frações anteriores.

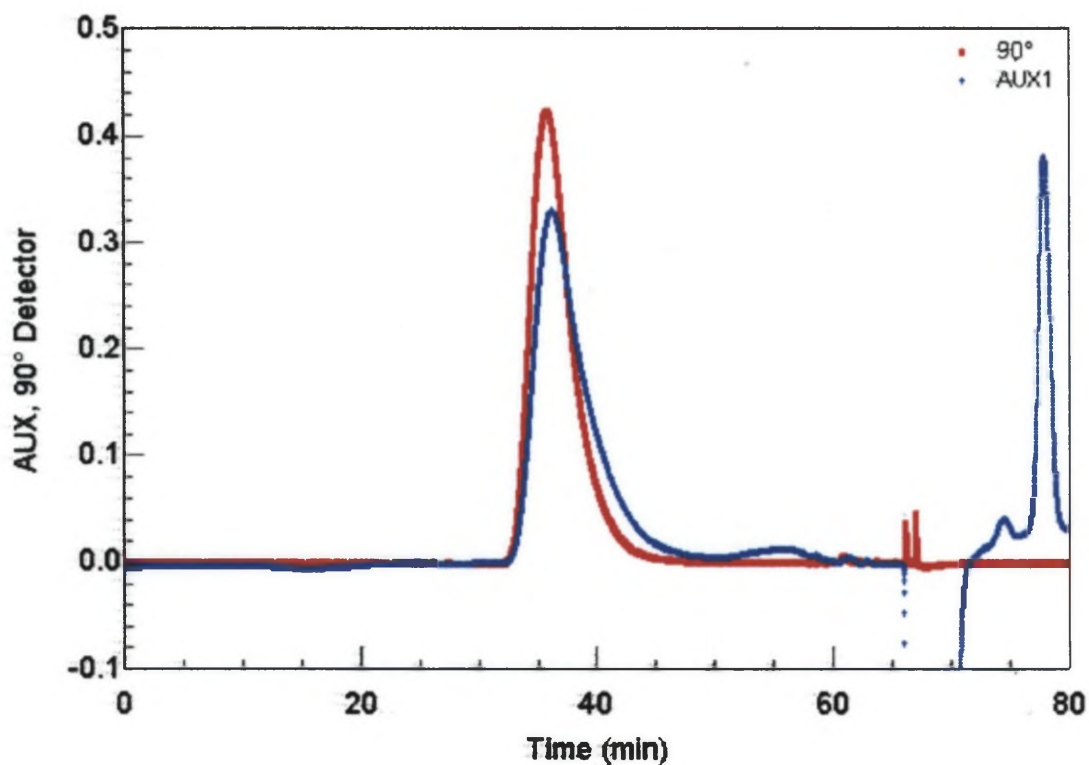


FIGURA 12 – Teste de homogeneidade realizado com o gel T<sub>4</sub>, por HPSEC-MALLS. (AUX. – detector diferencial de índice de refração; 90° – Detector de espalhamento de luz em um ângulo de 90°)

Neste gráfico da Figura 12, apareceu um pequeno pico detectado por IR aproximadamente no tempo de 55 minutos não existente nas análises de tempos menores de germinação. Esta poderia ser uma indicação de que moléculas diferentes das anteriores surgiram, provenientes da ação enzimática durante a germinação. Estas moléculas seriam menores que as primeiras.

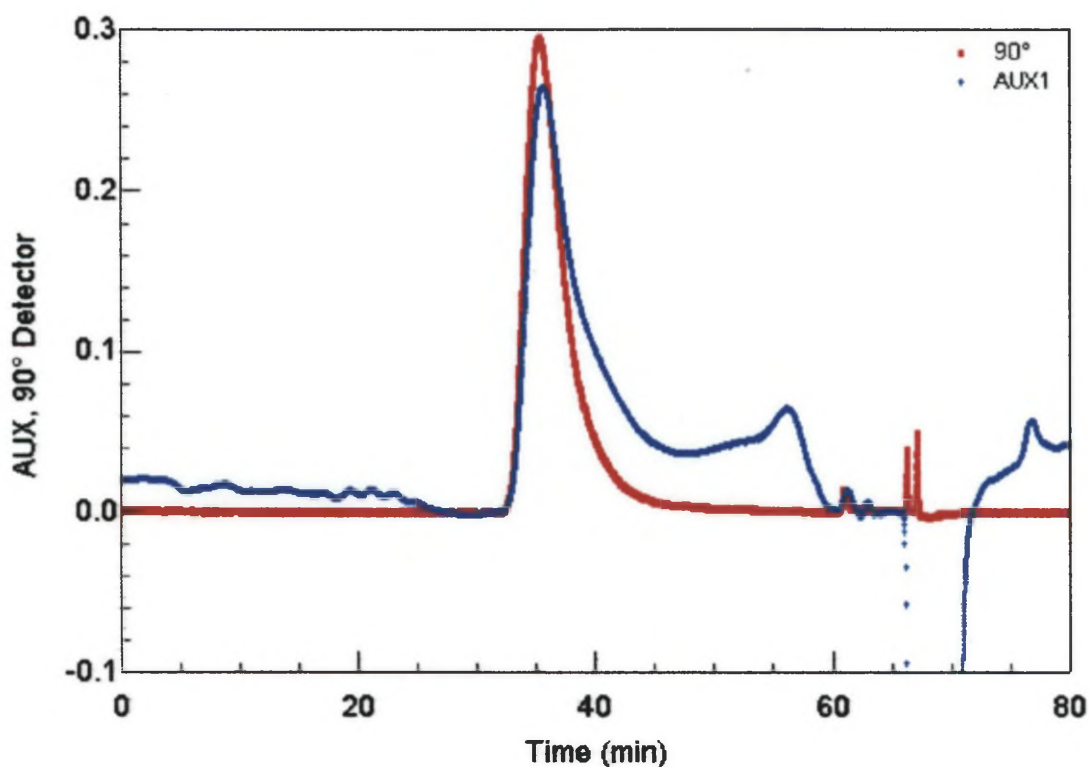


FIGURA 13 – Teste de homogeneidade realizado com o gel T<sub>5</sub>, por HPSEC-MALLS. (AUX. – detector diferencial de índice de refração; 90° – Detector de espalhamento de luz em um ângulo de 90°)

No último gráfico de homogeneidade pode-se visualizar claramente a presença de moléculas diferentes das do pico principal, provavelmente resultantes de ação enzimática durante a germinação das sementes.

A massa molar média desta fração, obtida através do cálculo do  $dn/dc$ , foi de 515.000. Como o gel T<sub>5</sub> possui mais de um tipo de molécula, a massa molecular calculada corresponde à média de todas as moléculas da fração. Este valor de massa indicou moléculas de tamanho menor no gel T<sub>5</sub> em relação ao T<sub>0</sub>.

Para uma visualização geral de todos os tempos de germinação nos quais ainda havia gel, foi feito um gráfico de massa cumulativa (figura 14), mostrando os diferentes tamanhos de molécula dos géis de cada tempo de germinação.

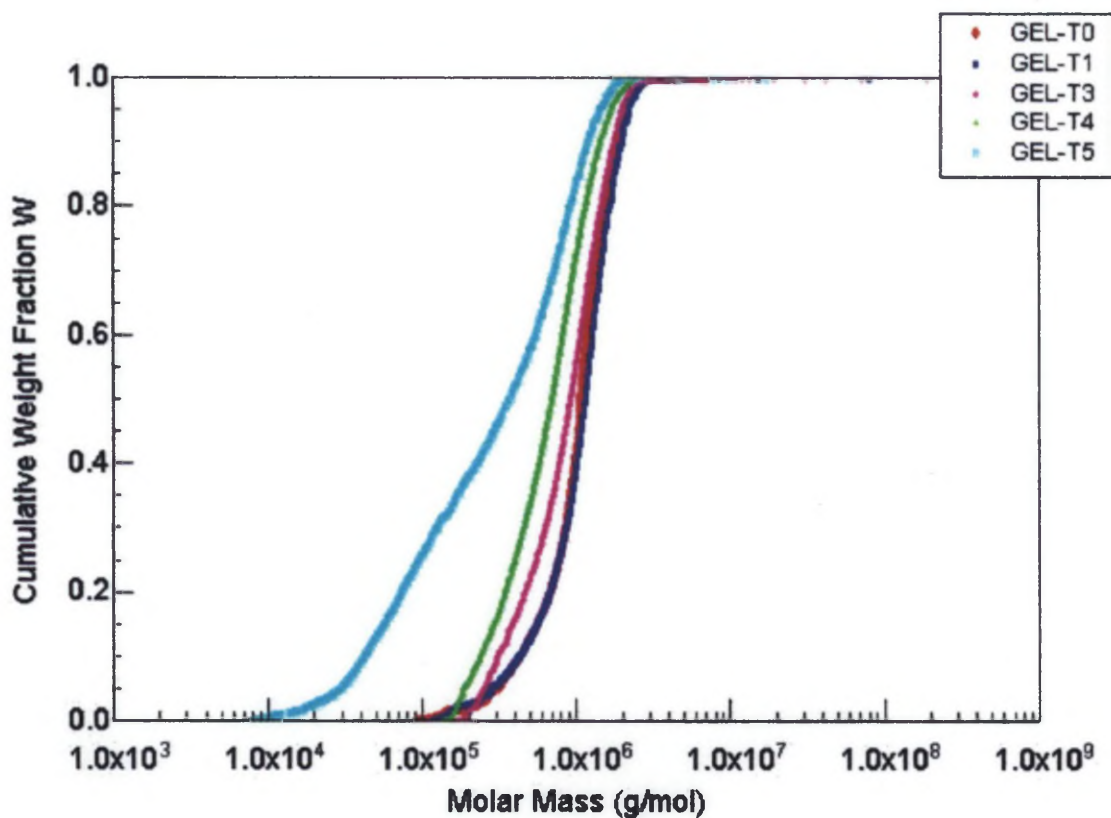


FIGURA 14 – Gráfico de massa cumulativa mostrando os géis  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_3$ ,  $T_4$  e  $T_5$ .

Podemos observar que os géis de  $T_0$ ,  $T_1$ , e  $T_3$ , apresentam praticamente o mesmo perfil, ou seja, o mesmo tamanho de moléculas em quantidades idênticas.  $T_4$  apresentou além do pico principal, moléculas menores e  $T_5$  diferenciou-se de uma forma mais acentuada das demais frações, mostrando moléculas de vários tamanhos e uma grande proporção de moléculas menores em relação às demais frações.



As curvas de  $T_0$  e  $T_1$  são praticamente superpostas, indicando que a galactomanana não é consumida no início da germinação. Uma fonte energética alternativa para estes primeiros dias seriam carboidratos de baixo peso molecular da família da rafinose, conforme isolados em *Mimosa scabrella*, uma Mimosaceae (GANTER et al., 1991; JOLY, 1993). Esta família de plantas é muito próxima das Caesalpiniaceae, à qual pertencem as espécies estudadas no presente trabalho.

Como os géis passaram por uma precipitação etanólica antes das análises, os mono e oligossacarídeos presentes não sofreram precipitação e, desta forma, encontram-se excluídos dos resultados obtidos, pois permaneceram no sobrenadante etanólico.

## 5. CONCLUSÃO

- Foi verificado que o endosperma de *S. parahybae* e *S. amazonicum* é formado por um gel de galactomananas envolto por uma membrana externa (espessa) e uma membrana interna (delgada).

- As membranas internas de ambas as espécies não possuem mananas puras, pois a quantidade de manose presente não alcançou o limite mínimo de 95%.

- Através deste trabalho, podemos concluir que existe uma manana verdadeira presente no endosperma também de *S. parahybae*, da mesma forma que em *S. amazonicum*, conforme descrito por PETKOWICZ (1998). A manana está localizada na membrana externa do endosperma. Este resultado reforça mais uma vez a similaridade entre as duas espécies.

- O gel de galactomanana, durante a germinação, é totalmente consumido pelo embrião. A galactomanana começa a ser degradada no endosperma a partir do quarto dia após a germinação. Antes disso, as análises por HPSEC-MALLS mostraram um perfil homogêneo dos géis, não havendo modificações em sua massa ponderal média.

- As membranas externas no 12<sup>o</sup> após a germinação (T<sub>12</sub>) apresentaram uma manana pura, que não foi consumida pelo embrião. Podemos sugerir que estas mananas isoladas do endosperma das sementes do gênero *Schizolobium* possuem função estrutural, diferente daquela de *Phytelephas macrocarpa*, conhecida como "ivory nut" que apresentam função de reserva (AVIGAD e DEY, 1997).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASPINALL, G. O. ; HIRST, E. L.; PERCIVAL, E. G. V.; WILLIAMSON, I. R. The mannans of ivory nut (*Phytelephas macrocarpa*). Part I. The methylation of mannan A and mannan B. *J. Chem. Soc. London*, p.3184-3188, 1953.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBONE, J. B. *Plant Biochemistry*. London: Academic Press, p. 143-204, 1997.
- CHATTERTON, N. J.; HARRISON, P. A.; THORNLEY W. R. and BENNETT, J. H. Sucrosyloligosaccharides and cool temperature growth in 14 forb species. *Plant Physiol. Biochem.* 28, 167-172, 1990.
- CORRÊA, A. A. Essências papleiras de reflorestamento: 8 madeiras nativas da Amazônia. *Acta Amazônica*, Manaus, v.15, p. 371-402, 1985.
- CORRÊA, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Rio de Janeiro, v.1 Ed. Imprensa Nacional, 747p., 1984.
- DEA, I. C. M. The role of structural modification in controlling polysaccharide functionality. *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/ Properties, relations and Applications*. Ed. Elsevier, Amsterdam; p. 207-216, 1987.
- DEY, P. M. Biochemistry of plant galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 341-376, 1978.
- DEY, P. M. D-galactose-containing oligosaccharides. In *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*. Dey, P. M. and Dixon R. A., ed. Academic Press, New York, 53-129, 1985.

- DUTTON, G. G. S.; HUNT, K. The constitution of the hemicellulose of sitk spruce (*Picea sitchensis*). II Structure of the mannan portion. *J. Am. Chem. Soc. Washington*, v. 80, p. 5697-5701, 1958)
- GANTER, J.; CORREA, J.; REICHER, F.; HEYRAUD, A. and RINAUDO, M. Low molecular weight carbohydrates from *Mimosa scabrella* seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 29, 139-146, 1991.
- GORIN, P. A. J. ; MAZUREK, M. Further Studies on the Assignment of signals in <sup>13</sup>C Magnetic Resonance Spectra of Aldoses and derived Methyl Glycosides. *Can. J. Chem.*, Canada, v.53, p. 1212-1224, 1975.
- HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. *Phytochemistry (Oxf)*, v.34, n.1, p.3-16, 1993.
- HORVEY, K. F. & WICKSTROM, A., The structure of galactomannans from white clover seeds (*Trifolium repens* L.). *Acta chem. Scand.*, v. 18; p. 833-834, 1964.
- JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. 11 ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 777p. 1993.
- JONES, J. K. N. The structure of the mannan present in *Porphyra umbilicalis*. *J. Chem. Soc. London*, p. 3292-3295, 1950.
- LEHNINGER, A. L.; et alli. *Princípios de Bioquímica*. 2 ed. São Paulo. Ed. Sarvier, 797p., 1995.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. São Paulo Ed. Plantarum Ltda., 351p., 1992.

- PETKOWICZ, C. L. O. Biopolímeros da semente de *Schizolobium amazonicum* (pinho cuiabano): galactomananas e arabinanas. *Tese de Mestrado*, Departamento de Bioquímica, UFPR, Brasil, 106p., 1993.
- PETKOWICZ, C. L. O. *et al.* Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpinaceae. *Phytochemistry*. Oxford, v.49, p.737-743. 1998.
- RACKIS, J. J.; Oligosaccharides of food legumes:  $\alpha$ -galactosidase activity and flatus problem. In: ALLEN J. and HEILGE J. *Physiological effects of food Carbohydrates*. ed. A. C. S. Symp. Ser., p. 207- 222, 1975.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. ed. Guanabara Koogan 728p. 1996.
- REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: Structural carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J. B. *Plant Biochemistry*. London: Academic Press, p. 205-236, 1997.
- REID, J. S. G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). *Planta* 100, 131-142, 1971.
- SAEMAN, J.F. *et al.* Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tech Assoc. Pulp. Pap. Ind.* 37(8) 336-343, 1954.
- SINGH, R.; AGGARWAL A.; BHULLAR, S. S. and GOYAL, J. Import of sucrose and its partitioning in the synthesis of galactomannan and raffinose oligosaccharides in the developing guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) seed. *J. Exp. Bot.*, 41, 101-110, 1990.
- STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharide. In: ASPINALL, G. O. *The polysaccharides*. New York, Academic Press, v.2, p. 98-180, 1983.

WAGNER J. R.; BECKER R.; GUMBMAN M. R. and OLSON A. C. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose and oligosaccharide-free bean residue. *J. Nutr.* 106, 466-470, 1976.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Redution with Sodium borohydrite. *Meth. Carbohydr. Chem.* New York. v. 2; p. 65-68, 1963.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetilation. *Meth. Carbohydr. Chem.*, New York. v. 2; p. 211-215, 1963.

YALPANI, M. *Polysaccharides*, New York, Ed. Elsevier, 499p. 1988.

ZAWADZKI-BAGGIO, S. F. Arabinana e galactomanana de *Schizolobium parahybum*; Estudo de Biossíntese de Galactomananas. *Tese de Doutorado*. Departamento de Bioquímica, UFPR, Brasil, 149p. 1994.