



MARIA SILVIA [SENO 59

COMPOSIÇÃO E MORFOLOGIA DE FEIJÃO GUANDU, LAB LAB E MUCUNA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Biologia celular.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo t
Co-orientadora: Profª Drª Laurecir Gomes t

Campinas - 1993

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Maria Silvia Seno e aprovada pela Comissão Julgadora.

Angelo Cortelazzo
01/10/93

Se59c

UNICAMP

A meus pais Gilberto e Maria Rosa

A meu marido Paulo e minha filha

Ana Paula.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes pela co-orientação e amizade.

A Profa. Dra. Elizabete Frollini e aos Professores Doutores José Osmar Gaspar e Edson Rosa Pimentel pela valiosa leitura deste manuscrito.

Ao Prof. Dr. Jean Paul Joseleau, responsável pelo setor de "biochimie de la paroi" do Centre de Recherches sur les Macromolecules Vegetales (CERMAV) em Grenoble, França, por permitir a realização das análises de açúcares e auxiliar na discussão dos resultados obtidos.

A Sra. Andree Lefebvre, do CERMAV pelo auxílio no processamento dos materiais para a análise cromatográfica.

Ao Dr. Alain Peggy pelo processamento do material para a Microscopia Eletrônica de Varredura, realizada no CERMAV.

A toda minha família e meus pais, Gilberto e Maria Rosa pelo carinho e incentivo.

A meu marido Paulo pela compreensão e apoio em todas as horas.

Ao Professor Sebastião Roberto Taboga pelo auxílio nos métodos citoquímicos e pela amizade.

Ao Polo Computacional do IBILCE pelo uso do Internet, especialmente ao José Maria, Adélio e Cristiano.

Ao Prof.Dr. Ranga do Departamento de Computação e Estatística pela gentileza na impressão deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular que acompanharam a realização deste trabalho.

Aos colegas José Lino Neto, Flávia Cabral, Ana Lúcia Monteiro, Sylvia Stuchi, Patrícia Parise, Daniela Covizzi, Adriana Herzog, Cristiana Begnami, Carmem Zichel pela amizade e colaboração.

A sessão de sementes do Instituto Agronomico de Campinas pelo fornecimento das sementes utilizadas neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma maneira colaboraram com a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA - Azul de Alcian
- AT - Azul de Toluidina
- BSA - Soroalbuminabovina
- CERMAV - Centre de Recherches sur les Macromolecules Vegetales
- EA - Etanol Ácido Acético
- FF - Ferricianeto Férrico
- KDa - Kilodaltons
- Me - Mercaptoetanol
- MF - Massa Fresca
- MS - Massa Seca
- MCW - Metanol Clorofórmio e Água
- PAS - Periodic Acid Schiff
- PCA - Ácido Perclórico
- PF - Paraformaldeído
- SA - Safranina e Azul Astra
- SB - Sudan Black
- SDS - Sulfato Dodecil de Sódio
- SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS
- TCA - Ácido Tricloroacético
- XP - Xylidine Ponceau
- WSP - Polissacarídeo Solúvel em Água

ÍNDICE

Introdução.....	01
Material e Métodos.....	10
1. Sementes.....	10
2. Curva de Embebição.....	10
3. Análise in situ.....	11
3.1. Fixação.....	11
3.2. Processamento após fixação.....	12
3.3. Microscopia de Polarização.....	12
3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	13
3.5. Colorações.....	13
3.5.1. Safranina e Azul Astra.....	13
3.5.2. Azul de Toulidina.....	14
3.5.3. Azul de Alcian.....	14
3.5.4. Método do PAS.....	14
3.5.5. Xylidine Ponceau.....	15
3.5.6. Ferricianeto Férrico.....	15
3.5.7. Sudan Black.....	16
4. Extração de Lipídios, Carboidratos e Proteínas.....	16
4.1. Lipídios e Açúcares livres.....	16
4.2. Polissacarídeos Solúveis em Água e Amido.....	17
4.3. Proteínas.....	17
5. Dosagem de Carboidratos e Proteínas.....	18
5.1. Dosagem de Carboidratos.....	18
5.2. Dosagem de Proteínas Solúveis em NaOH 0,1 M.....	19
6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS.....	19
7. Análise de Açúcares.....	20
Resultados.....	21
1. Curva de Embebição.....	21
2. Análise "in situ" dos cotilédones.....	23
2.1. Caracterização Geral.....	23
2.2. Polissacarídeos.....	23
2.3. Material Proteico.....	26
2.4. Lipídios.....	31
3. Análise "in situ" dos Tegumentos.....	31
4. Extração e Dosagens.....	43
5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	45
6. Análise dos Açúcares presentes em Cotel. e Tegumentos.....	47
Discussão.....	50
1. Cotilédones.....	50
2. Tegumentos.....	59
Anexo.....	69
Conclusão.....	74
Resumo.....	77
Summary.....	79
Bibliografia.....	81

INTRODUÇÃO

Uma das principais fontes de alimento utilizadas pelo homem são as sementes, principalmente de cereais e legumes. Alimentos leguminosos geralmente são importantes fontes de proteínas (CHUNG & SATTERLEE **apud** DEKA & SARKAR, 1990; MARTINEX **apud** DEKA & SARKAR, 1990; PLATT **apud** DEKA & SARKAR, 1990) podendo assim auxiliar no problema de deficiência proteica em muitas partes do mundo. Podem também conter grandes quantidades de carboidratos, lipídios, vitaminas e elementos minerais (OYENUGA, 1980; LOLAS & MARKAKIS **apud** DEKA & SARKAR, 1990; UKHUN **apud** DEKA & SARKAR, 1990).

A família das leguminosas é composta de aproximadamente 600 gêneros de plantas que incluem cerca de 13.000 espécies, das quais apenas 10 a 15 são mais exploradas economicamente (AYKROYD & DOUGHTY **apud** SGARBIERI, 1980). Dentre elas, a sub-família Papilionoidae (Faboideae) é a mais numerosa e pertence a ela a maioria dos legumes utilizados na alimentação. Dentre os gêneros mais utilizados na alimentação destacam *Pisum*, *Vicia* e *Lens* no Oriente Médio; *Lab lab*, *Vigna* e *Cajanus* na África e Extremo Oriente e *Phaseolus* nas Américas. No Brasil a leguminosa mais consumida na alimentação é o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) com um grande número de variedades, seguido pela ervilha (*Pisum sativum*) e a lentilha (*Lens esculenta*). O amendoim (*Arachis hypogaea*) e a soja (*Glicine max*) são consumidos em pequenas quantidades na alimentação humana, a não ser na forma de óleo comestível e de alguns produtos industrializados (SGARBIERI, 1980).

Os carboidratos são armazenados como amido na forma de grãos. Este é o principal material de reserva nas sementes cultivadas como trigo, arroz, milho e feijão. Estima-se que são incorporadas cerca de $2 \cdot 10^{10}$ toneladas de carbono por ano no mundo e cerca de 4/5 das calorias consumidas pelos animais (homem incluso) são originárias do amido de três tipos de sementes (*Triticum*, *Oryza* e *Zea*) e de três tipos de raízes tuberosas (*Solanum*, *Manihot* e *Dioscorea*) segundo BORGSTROOM, **apud** JENNER (1982).

O amido é formado por amilose e amilopectina que são polímeros de glicose unidas através de ligações α 1-4 e amilopectina com ligações α 1-6 que formam assim ramificações na molécula, cuja frequência aproximada é de uma ramificação a cada dez unidades de glicose. (BANKS & MUIR, 1980). A forma e tamanho dos grãos de amido é variável entre as espécies sendo que o conteúdo de amilose em relação ao de amilopectina determina a forma do grão. Maiores quantidades de amilopectina tornam o grão mais elíptico e maiores quantidades de amilose mais esférico (BEWLEY & BLACK, 1985). O amido é armazenado em organelas chamadas amiloplastos. Estas organelas podem conter enzimas que participam na síntese dessa reserva. Sua quantidade é geralmente espécie-específica podendo variar de alguns grãos até dezenas (TZAI & NELSON, 1966; TURNER, 1969; SINGH & JULIANO, 1977; YAZOLI-SAMADI **et al.**, 1977; CORTELAZZO, 1992).

Em legumes, a reserva de amido é normalmente depositada nas células dos cotilédones. Geralmente o acúmulo se inicia concomitante ao acúmulo de albumina, e se estende até depois que é iniciado o amadurecimento do fruto (PATE, 1975).

A degradação de amido é feita pela α -amilase, que existe em pequenas quantidades nas sementes maduras. Em alguns casos, há também um incremento da quantidade de fosforilase e de β -amilase (VAN ONCKELEN *et al.*, 1977).

Em certas sementes, a maior quantidade de carboidratos de reserva não é formada por amido mas por outros polissacarídeos, sendo que os principais podem ser subdivididos em três grandes grupos: mananas, xiloglicanos e galactanas. Essas formas de reserva existem normalmente ao nível dos endospermas de certas espécies de Palmae, Umbelliferae e Leguminosae, mas também em cotilédones como por exemplo em espécies de Lupinus (MEIER & REID, 1982).

Os lipídios são outros tipos de reserva das sementes por exemplo amendoim, girassol e soja. A maioria são lipídios neutros, fosfolipídios, glicolipídios e esteróis. Os lipídios são encontrados nas sementes como gorduras ou óleos, dependendo da quantidade relativa de ácidos graxos saturados e insaturados formadores dos glicerídeos (BEWLEY & BLACK, 1985).

As proteínas das sementes, segundo OSBORNE (1924), podem ser divididas em quatro grupos baseados na solubilidade: albuminas, solúveis em água e tampões neutros; globulinas, solúveis em soluções salinas diluídas; prolaminas, solúveis em álcool 70% a 90% e glutelinas, solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas. A maior parte das proteínas presentes em leguminosas são globulinas. Estudos realizados por DANIELSON (1949), em 34 espécies de legumes, de 8 tribos diferentes, das quais 29 espécies da sub-família Faboideae, revelaram que, com poucas exceções, todas as globulinas contêm dois coeficientes de sedimentação característicos: 7S e 11S

que são respectivamente vicilinas e leguminas. Estas proteínas apresentam diversas subunidades com pesos moleculares que variam em geral de 2.000 a 70.000 daltons (BAILEY & BOULTER, 1972; MCLESTER *et al.*, 1973; DERBYSHIRE *et al.*, 1976).

Uma característica comum a todas as leguminosas é a baixa concentração de metionina e cisteína. A metionina é considerada o aminoácido limitante do valor biológico dessas proteínas por ser ele nutricionalmente essencial para o organismo animal. A cisteína apesar de poder ser sintetizada pelos animais, assume muita importância em alimentação, porque a sua síntese se dá a partir da metionina, o que reforça a importância deste aminoácido essencial. Também o teor dos aminoácidos sulfurados em leguminosas é muito baixo (DERBYSHIRE *et al.*, 1976; SGARBIERI, 1980).

A digestibilidade das proteínas e de amido depende em grande parte da atividade dos inibidores de tripsina e amilase. A importância fisiológica dessas substâncias para a planta não é conhecida, como também se discute muito ainda a importância das mesmas em nutrição animal e humana. Várias espécies de sementes de leguminosas são tóxicas quando ingeridas cruas, provocando inibição do crescimento e podendo causar a morte de animais de pequeno porte. O efeito mais direto dos inibidores de tripsina e de amilase é o de inibir parcialmente a ação das enzimas digestivas, prejudicando a utilização biológica das proteínas e do amido. Os valores para a digestibilidade "in vitro", é variável mesmo entre variedades de uma mesma espécie (SGARBIERI, 1980). A digestibilidade é caracterizada pela diferença entre a quantidade

de matéria seca consumida e a quantidade de matéria seca eliminada pelo animal.

Além da grande importância econômica na alimentação humana e animal, as leguminosas são também importantes no aproveitamento do solo, como forrageira e adubo verde. Seu uso para essas finalidades, não são devido apenas ao enriquecimento em matéria orgânica proporcionado ao solo e indispensável ao melhoramento de suas propriedades físicas e químicas, mas também sua associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico permitindo um incremento adicional considerável desse nutriente no solo (ROLFE & GRESSHOFF, 1988).

Mucuna é uma das leguminosas mais vigorosas que se conhece, apresentando cipós com 6 a 8 metros de comprimento. Também é chamado de feijão veludo pois seus ramos e frutos são cobertos de um leve pêlo aveludado. É uma planta anual, exótica, originária das Antilhas. Mucuna é utilizada como planta forrageira pela sua excelente composição química, facilidade de cultura, perfeita aceitação pelo gado tanto verde como fenada. As sementes e vagens moídas constituem um ótimo alimento concentrado, rico em material nitrogenado e carboidratos. Nas folhas é que reside a maior parte dos princípios alimentícios com a mais elevada digestibilidade. Também é uma das leguminosas mais utilizadas para adubação verde e silos pela grande quantidade de matéria orgânica que produz (MENEGARIO, 1966).

Guandu é uma leguminosa exótica, perene e arbustiva. A principal finalidade da cultura desta planta é a utilização das sementes para alimentação humana. A folhagem e as sementes

constituem excelente alimento para o gado. Também é utilizado como feno ou em silos. As sementes podem ser reduzidas à farinha para alimentação do gado, só ou juntamente com vagens. Guandu é utilizado como adubo verde (MENEGARIO, 1966).

Lab lab é originária da Índia. É uma planta herbácea, perene mas cultivada como anual. O feijão é consumido com ou sem casca na cozinha de várias partes da Índia. Além de ótimo adubo verde, esta leguminosa se apresenta como uma boa forrageira para bovinocultura (LOVANDINI, 1972). DEKA e SARKAR (1990), realizaram a análise de vários cultivares de Lab lab quanto a sua composição nutricional e antinutricional e concluíram que suas sementes podem ser muito proveitosas como fonte de alimento. Embora haja alta concentração de fatores antinutricionais em todos os cultivares, não há problemas se o feijão for devidamente processado, o que ocorre com um cozimento prolongado.

As sementes de Lab lab podem ser usadas amplamente como fontes de alimento para o gado, melhorando a qualidade da produção dada a sua riqueza em proteínas e carboidratos (DEKA e SARKAR, 1990).

Com o advento da agricultura em larga escala, foi necessário estocar as sementes produzidas para consumo ou novo plantio. O primeiro caso foi mais simples de ser resolvido mas, para a utilização na agricultura, elas não podem perder sua viabilidade e capacidade germinativa o que ainda é um problema econômico importante (BEGNAMI, 1991).

Altas temperaturas e umidades relativas do ar são fatores decisivos para a aceleração do processo de envelhecimento das

sementes, com conseqüente perda de viabilidade. Inúmeros trabalhos vem sendo realizados no sentido de explicar as alterações sofridas pelas sementes durante o envelhecimento. Assim, alterações ocorridas nas membranas celulares (AMABLE & OBENDORF, 1986; FERGUSON *et al.*, 1990), alterações de atividades enzimáticas (PUNTARULO & BOVERIS, 1990), síntese protéica (OSBORNE, 1983) e alterações no núcleo e nucléolo (VILLIERS, 1983; BEGNAMI, 1991) são reportadas durante esse processo.

Os tegumentos são as estruturas da semente que entram diretamente em contato com o meio externo. Existem poucos dados sobre a composição e estrutura dos tegumentos de sementes, mesmo viáveis, quer elas sejam ortodoxas ou recalcitrantes. Sementes ortodoxas são aquelas que resistem a baixos teores de umidade sem perda de viabilidade. Sementes recalcitrantes são as que apresentam um valor crítico alto para o seu conteúdo de umidade (ROBERTS, 1972). Assim, as primeiras são mais facilmente estocáveis se mantidas em baixas temperaturas e teores de umidades.

Outro aspecto importante para o aproveitamento das sementes para a agricultura é o fato de existirem sementes que mesmo viáveis não germinam devido a vários fatores tais como impermeabilidade da testa à água, imaturidade do embrião, presença de inibidores, exigências especiais de luz, temperatura, etc. (BEWLEY & BLACK, 1982). Impermeabilidade da testa da semente é um problema que vem sendo abordado há alguns anos e sabe-se que algumas substâncias ou estruturas especiais podem provocar esse tipo de dormência. Assim, em *Gossypium* e *Sida* ocorre uma deposição de lignina no tegumento que serve como barreira à água (REEVES & VALLE, 1932; EGLEY *et al.*,

1986). Além dessa substância, a presença de suberina entre as células paliçádicas de *Cercidium floridum* (SCOTT *et al.*, 1962), cutículas espessas ou depósitos externos de cera em diversas espécies de *Prosopis* (TRIVEDI *et al.*, 1979; VALENTI *et al.*, 1986; BEVILACQUA *et al.*, 1987) e fenóis em variedades de testa rígida de soja (HARRIS, 1987), podem causar uma dormência devida a impermeabilidade da testa à água.

A testa da maioria das sementes impermeáveis, principalmente em leguminosas, apresenta características anatômicas especiais que conferem rigidez ao tecido. Assim, é comum a presença de uma camada de células em paliçada com macrosclereídeos e abaixo desta, osteoesclereídeos (ROLSTON, 1978). Em leguminosas, os osteoesclereídeos apresentam forma de ampulheta (CUTTER, 1978).

Estudos recentes com *Bixa orellana* (AMARAL, 1990) mostraram que para essa espécie, ocorre provavelmente uma deposição de hemiceluloses na região da testa, que é dura e impermeável. Resultados que vem sendo obtidos para *Delonix regia* (Leguminosae, Caesalpinoideae) por PAPP & CORTELAZZO (comunicação pessoal), tem mostrado o mesmo padrão de resultados obtidos em urucum. Entretanto, faltam na literatura informações detalhadas sobre as análises de tegumentos de sementes permeáveis, tanto ao nível citoquímico, como bioquímico.

Guandu, Lab lab e Mucuna são sementes ortodoxas e que não apresentam nenhum tipo de dormência. Assim, podem ser consideradas como bons modelos para aumentar o número de informações sobre as características anatômicas e composição química de sementes com

esses predicados, normalmente menos estudadas, por não apresentarem os problemas comentados anteriormente.

Do mesmo modo, dada a importância dessas espécies na alimentação, adubação e forragem, a maior parte dos trabalhos sobre as mesmas, aborda esses aspectos economicamente importantes, sendo muito restritos os dados existentes sobre a localização e caracterização de suas reservas e, principalmente, de seus tegumentos.

Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo o estudo das sementes de Feijão Guandu, Lab lab e Mucuna com a finalidade de:

1. Caracterizar, ao nível citoquímico e bioquímico, as principais reservas presentes nos cotilédones dessas sementes.

2. Caracterizar, principalmente ao nível citoquímico e anatômico, os tegumento dessas sementes.

3. Comparar os resultados obtidos pelos métodos utilizados, ao nível dos cotilédones e tegumentos, aos resultados existentes para outras espécies, principalmente de testa impermeáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Sementes.

No presente trabalho foram utilizadas sementes de três leguminosas da sub-família Faboideae: *Cajanus cajan* L. Mill. SP Fava Larga (Guandu); *Lab lab purpureum* L. Sweet. - IAC-697 (Lab lab) e *Mucuna aterrima* - IAC (Mucuna preta), obtidas na Sessão de Sementes do Instituto Agronômico de Campinas. Os conteúdos de matéria fresca (MF) e seca (MS) (determinada após secagem em estufa a 80°C) foram determinados em balança analítica. De cada uma das espécies foram utilizadas 40 sementes e determinada a média.

2. Curva de Embebição.

Uma curva de embebição foi feita a partir da detecção da MF de três lotes (10 sementes/lote) de cada uma das espécies, com posterior pesagem após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36 e 48 horas de embebição em 50 ml ^{de} água destilada. Os resultados foram expressos em porcentagem sendo considerada igual a 100% a MF inicial.

3. Análise "in situ".

A análise "in situ" foi feita nos tegumentos e cotilédones das três espécies utilizadas. Assim, procedeu-se a separação dessas estruturas antes do início da fixação, exceto em alguns casos, especificados no texto.

3.1. Fixação.

Tegumentos e cotilédones foram subdivididos em três diferentes lotes e fixados nas seguintes soluções e condições:

1ª porção: Solução de paraformaldeído (4%) e glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 (PF). A fixação foi durante 48 horas a 5 °C (KIERNAN, 1981). Após esse tempo foram colocados durante 72 horas em ácido fluorídrico e a seguir, lavados por um período de 24 horas em água corrente (MAIA, 1979).

2ª porção: Solução contendo 3 partes de etanol 100% e 1 parte de ácido acético glacial (EA) v/v. Os materiais foram fixados durante 30 minutos a temperatura ambiente (MAIA, 1979). Após este período, procedeu-se da mesma forma já descrita para a 1ª porção.

3ª porção: A fixação foi em solução aquosa de formol a 10% durante 48 horas a 5 °C e lavado durante 24 horas em água corrente (MAIA, 1979).

3.2. Processamento após Fixação.

Os materiais submetidos a primeira e segunda fixações (PF e EA), permaneceram 72 horas no ácido fluorídrico e após lavagem durante 24 horas em água corrente foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, de 70% a 100%. A seguir foram colocadas em xilol por 30 minutos e incluídos em parafina. Foram feitos cortes longitudinais (tegumentos e cotilédones) ou transversais (cotilédones) com 8 μm de espessura utilizando micrótomo manual R-Jung-Heidelberg. Os cortes foram desparafinizados em xilol e metanol:clorofórmio (1:1) e reidratados em etanol (100% a 70%) (LISON, 1960).

Os materiais fixados em formol a 10% foram cortados com 20 μm de espessura em micrótomo de congelação, coletados diretamente em lâminas e deixados secar ao ar.

3.3. Microscopia de Polarização.

Cortes feitos manualmente (com lâmina de barbear) e a fresco foram colocados em lâmina, imersos em água, lutados com esmalte e observados em microscópio Zeiss adaptado para a polarização, com analisador e polarizador cruzados, para a visualização da birrefringência das paredes celulares e dos grãos de amido (VIDAL, 1987).

3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Os tegumentos foram enviados ao CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolecules Vegetales) em Grenoble, França, onde foram cortados manualmente, desidratados rapidamente em acetona e recobertos por ouro vaporizado. Os materiais assim processados foram observados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 6100) a 10 KV de tensão e fotografados.

3.5. Colorações.

3.5.1. Safranina e Azul Astra (SA).

Para uma visualização geral dos tecidos, cortes dos materiais fixados em PF e EA foram corados com solução de safranina a 1,5% em etanol 50% durante 30 minutos, colocados em etanol a 50% por 5 minutos e a seguir submetidos a quatro banhos de água destilada. A contra coloração foi feita com solução aquosa de azul de astra a 1% durante 1 minuto e o excesso de corante retirado com água destilada, seguindo-se desidratação com etanol 95% e 100%. (JOHANSEN, 1940).

3.5.2. Azul de Toluidina (AT).

Para a detecção de grupos aniônicos e metacromasia foi utilizado a metodologia segundo VIDAL (1977). Os cortes obtidos dos materiais fixados em PF e EA, foram corados durante 15 minutos em solução de AT 0,025% em tampão McILVAINE a pH 4,0, lavados em água destilada e secos ao ar.

3.5.3. Azul de Alcian (AA).

Para detecção de açúcares ácidos foi utilizado o método de MELLO E VIDAL (1980). Os cortes foram fixados em EA e corados durante 30 minutos com AA a 1% em ácido acético 3%, pH 2,5 (açúcares ácidos totais) ou com AA 1% em HCl 0,1 N, pH 1,0 (açúcares sulfatados).

3.5.4. Método do PAS .

Como forma de evidenciar os polissacarídeos neutros, cortes obtidos após fixação em EA foram submetidos ao método do PAS. Os materiais foram oxidados durante 9 minutos com ácido periódico a 0,5%, lavados em água destilada e secados ao ar. A seguir, foram colocados em Reativo de Schiff (LILLIE, 1954) durante 15 minutos no escuro. Após a coloração foram submetidos a três banhos

consecutivos de 3 minutos cada em água sulfurosa (18 partes de água destilada, 1 parte de HCl 1 N e 1 parte de metabissulfito de sódio 10%), seguidos de uma rápida desidratação em etanol 95 e 100% (MELLO & VIDAL, 1980).

3.5.5. Xylidine Ponceau (XP).

Para a detecção dos radicais catiônicos, cortes obtidos da fixação em PF foram corados por 15 minutos em XP a 0,1% em ácido acético a 3%, pH 2,5 a temperatura ambiente. Após a coloração, os materiais foram lavados em ácido acético 3% durante 30 minutos, desidratados em etanol 95% e 100% (VIDAL, 1970).

3.5.6. Ferricianeto Férrico (FF).

A detecção de compostos redutores foi feita nos cortes de sementes com casca e fixadas em PF. Os cortes desses materiais foram tratados durante 10 minutos em solução aquosa de ferricianeto de potássio a 0,1%, e cloreto férrico a 0,75%. Após esse tempo, os cortes foram lavados em ácido acético a 1%, desidratados em etanol 95% e 100% (LISON, 1960).

Após os métodos de coloração acima descritos, as lâminas permaneceram durante 10 minutos em xilol e a seguir foram montadas em Bálsamo do Canadá.

3.5.7. Sudan Black (SB).

Cortes obtidos com o micrótomo de congelação foram corados durante 30 minutos em solução de SB a 0,7% em etanol 70% lavados rapidamente em álcool 70% e deixados secar ao ar, sendo posteriormente montado em água (MAIA, 1979).

Todas as observações foram realizadas em microscópio Zeiss com sistema fotográfico acoplado.

4. Extração de Lipídios, Carboidratos e Proteínas.

Todas as extrações foram realizadas em triplicata a partir de 0,5 g de farinha obtida após moagem dos cotilédones das três espécies estudadas. As centrifugações foram em centrífuga Beckman refrigerada, rotor JA-20.

4.1. Lipídios e Açúcares livres.

Para a extração de lipídios e açúcares livres, os materiais foram colocados em 10 ml de metanol, clorofórmio e água (MCW) 12:5:3 v/v/v e submetidos a três centrifugações de 10.000 rpm durante 10 minutos cada. A seguir foram estocados a -20 °C. Para cada quatro volumes dos sobrenadantes obtidos foi acrescentado um

volume de metanol e um volume e meio de água destilada. As soluções foram colocadas em funil de decantação durante 48 horas. Após esse tempo, as fases inferiores foram recolhidas e os solventes evaporados. A seguir o resíduo foi pesado e obteve-se os valores para lipídios. As fases superiores foram recolhidas e submetidas a dosagem de açúcares livres.

4.2. Polissacarídeos Solúveis em Água e Amido.

Os precipitados da centrifugação anterior foram submetidos a duas novas centrifugações de 10.000 rpm durante 10 minutos. Após cada centrifugação o precipitado foi solubilizado com 10 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Com os sobrenadantes foram feitas dosagens de WSP. Após as duas centrifugações com TCA a 10% os precipitados foram solubilizados com 10 ml de ácido perclórico (PCA) a 30% e centrifugados durante 15 minutos a 15.000 rpm. Os precipitados desta última centrifugação foram solubilizados e centrifugados nas mesmas condições por mais quatro vezes. Com os sobrenadantes foram feitas dosagens de amido.

4.3. Proteínas.

Extrações com MCW foram realizadas nas mesmas condições especificadas no item 4.1 de materiais e métodos. Os precipitados obtidos foram deixados em 10 ml de NaOH 0,1 M durante 16h a 4 °C e

centrifugados a 13000 rpm durante 15 minutos. Aos sobrenadantes obtidos foi adicionado PCA para uma concentração final de 5% e incubados durante 1 hora a 4 °C. Após esse período foram mantidas durante 10 min a 90 °C e a seguir centrifugadas. Os precipitados foram ressuspensos em NaOH 0,1 M e submetidos a dosagem de proteínas.

5. Dosagem de Carboidratos e Proteínas.

5.1. Dosagem de Carboidratos.

A dosagem de WSP, amido e açúcares livres foi feita pelo método de antrona (McCREADY et al, 1950). Duzentos mg de antrona foram colocadas em 100 ml de ácido sulfúrico a 95%. Para cada 1 ml de cada amostra foi acrescentado 2 ml do reagente de antrona. Após agitação, os tubos foram aquecidos e mantidos durante 5 minutos em água fervente, (SCOTT & MELVIM, 1953). As leituras das absorvâncias foram feitas a $\lambda=620$ nm. Os valores encontrados foram confrontados aos obtidos a partir de curva padrão feita com soluções aquosas de dextrose com concentrações crescentes (10 a 60 $\mu\text{g/ml}$). Para o cálculo do amido, os resultados obtidos foram multiplicados pelo fator 0,9 (McCREADY et al., 1950).

5.2. Dosagem de Proteínas solúveis em NaOH 0,1 M.

O conteúdo proteico foi determinado pelo método da BRADFORD (1976). O reativo de Bradford foi preparado com Coomassie Blue G-250 (0,01%) dissolvido em etanol absoluto e ácido ortofosfórico (8,5%). A solução foi filtrada. A curva padrão foi feita a partir de soroalbumina bovina (BSA) com concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$. As leituras foram realizadas em $\lambda=595$ nm.

6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) com SDS foi feita segundo ZINGALES (1984). As amostras analisadas foram preparadas em tampão redutor (Tris HCl 62mM, pH 6,8; 2-Mercaptoetanol 0,2% e Azul de Bromofenol 0,01%) ou não redutor (Tris HCl 62 mM, pH 6,8 e Azul de Brmofenol 0,01%) e fervidas durante 3 minutos. O tampão utilizado na eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%. Para cada placa foram aplicados 15 mA durante 2 horas e 30 minutos. Padrões de peso molecular (Pharmacia Fine Chemicals-Uppasala, Sweden), foram sempre analisados em paralelo e continham β -galactosidase (116.000), fosforilase (97.000), soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000) e citocromo C (12.000). A coloração foi feita pelo Coomassie Blue R 250 a 0,2% em ácido acético 10% e metanol 50% durante uma hora e meia, e descoloração em metanol 50% e ácido acético 10%.

7. Análise de Açúcares.

Cotilédones e tegumentos foram liofilizados separadamente, moídos e enviados para análise cromatográfica dos açúcares no laboratório de bioquímica do CERMAV. Cerca de 5 mg de cada farinha obtida foram deixados em H_2SO_4 a 72% durante 16h a temperatura ambiente em tubos de ensaio. Após esse tempo, foi adicionado 0,5 ml de solução de inositol 1 mg/ml (padrão) e água destilada para diluir a solução para 1 N de H_2SO_4 . Após serem selados, os tubos foram mantidos a 100 °C durante 6 h para término da hidrólise. Procedeu-se então a neutralização com carbonato de bário e filtração. Os açúcares foram reduzidos com boroidreto de sódio na concentração de aproximadamente 20 mg/10 mg de açúcar, durante 16 h e acetilados com piridina / anidrido acético (1h30min a 100 °C) sendo então injetados em cromatógrafo a gás (JOSELEAU & CHAMBAT, 1984). Foi realizada a dosagem de açúcares ácidos segundo método de BLUMENKRANTS & ASBOE-HANSEN (1973).

RESULTADOS

1. Curva de Embebição.

Sementes de Guandu apresentaram um conteúdo de matéria fresca de 187 ± 20 mg e matéria seca de 161 ± 19 mg. Esses valores para Lab lab foram de 243 ± 35 mg e 221 ± 31 mg e para Mucuna, de 672 ± 130 mg e 630 ± 123 mg. Os valores obtidos para a variação de matéria fresca durante a embebição encontram-se na **Figura 1**. Pode ser notado que Lab lab apresenta uma embebição um pouco mais rápida do que Guandu. Essa diferença se manifesta mais claramente entre 5 e 12 horas de embebição. Após esse tempo, as duas espécies apresentaram valores iguais a cerca de 210% da matéria fresca inicial. A partir de 36 horas de embebição, pode se observar a germinação de inúmeras sementes dessas duas espécies.

Mucuna apresentou uma embebição nitidamente mais lenta que Guandu e Lab lab. Até 12 horas de embebição, a entrada de água foi bastante pequena (menor que 20% em relação a matéria inicial). Após esse tempo, houve um aumento significativo do teor de água e, apesar da grande variação observada, os resultados atingiram valores próximos ao dobro da matéria inicial (**Figura 1**). As sementes de Mucuna começaram a germinar apenas após 48 horas de embebição.

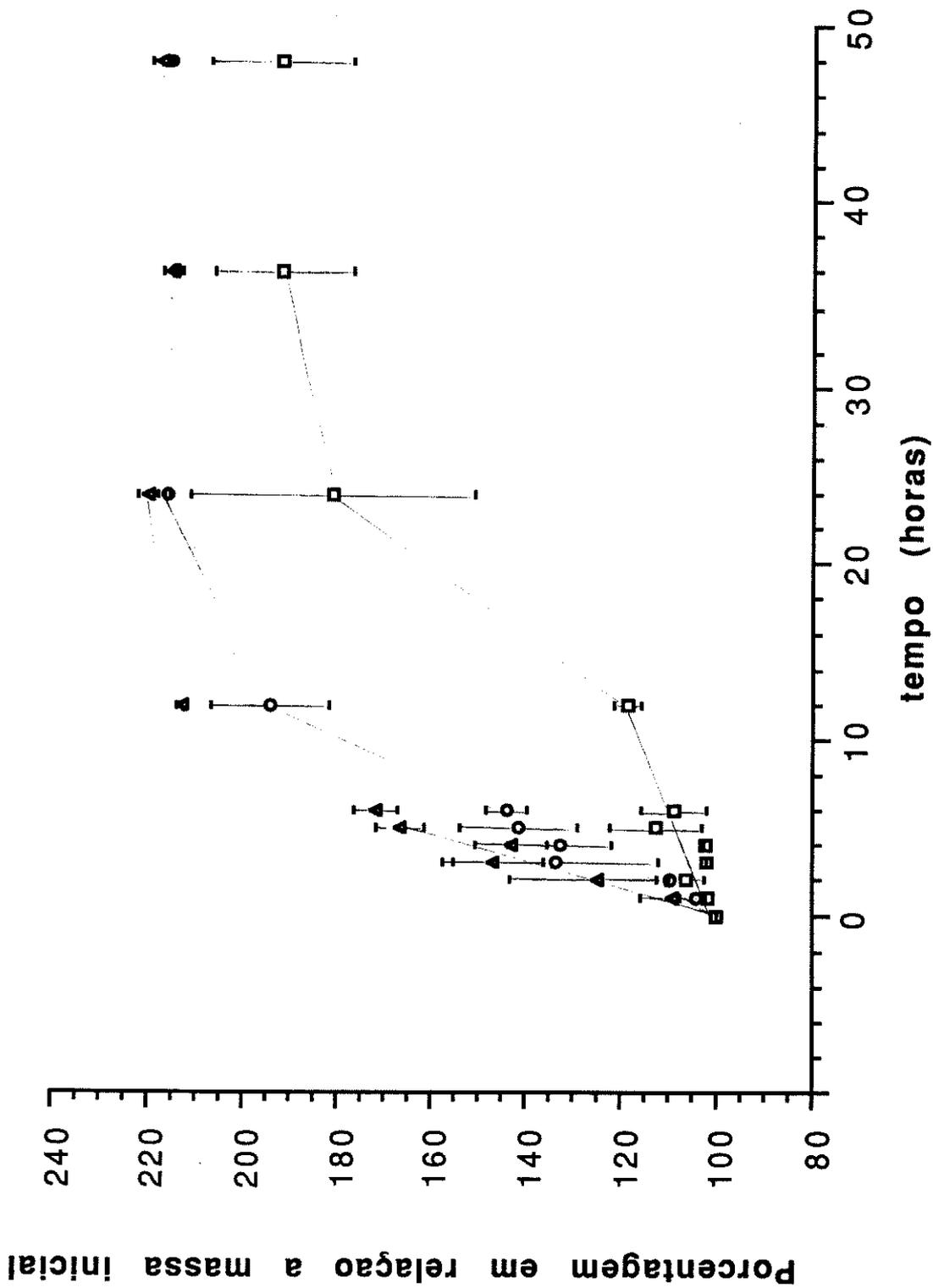


Figura 1: Curvas de embebição de feijão Guandu (Δ), Lab lab (Δ) e Mucuna (\square) durante 48h de embebição. Os valores correspondem as médias de 3 repetições e são expressos em porcentagem total em relação ao peso inicial das sementes.

2. Análise "in situ" dos Cotilédones.

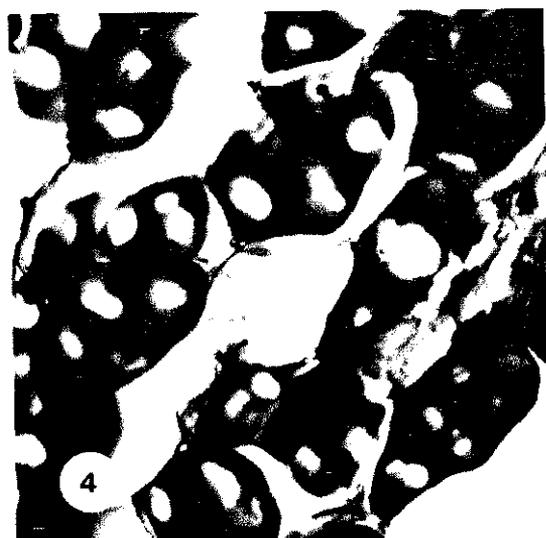
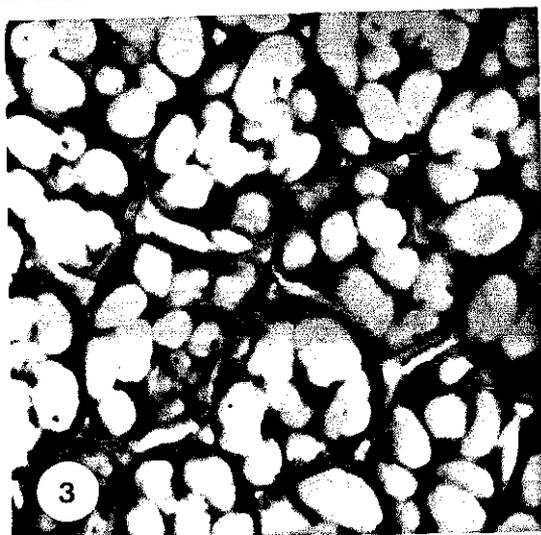
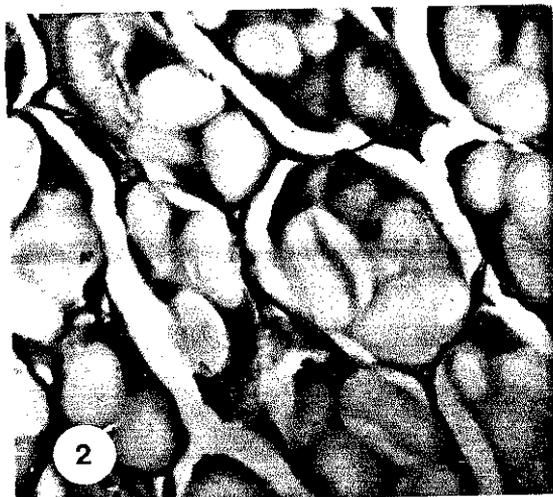
2.1. Caracterização Geral

As três espécies analisadas foram coradas com SA utilizando dois tipos de fixadores: PF e EA. Os materiais foram melhor preservados com PF como mostram as **Figuras 2 a 4**. Em todos os casos, as paredes celulares foram coradas pelo azul astra e nos citoplasmas o aparecimento de grânulos não corados e circundados por material safranina positivo. O Guandu apresentou grânulos citoplasmáticos em menor número e maior tamanho que as outras duas espécies (**Figura 2**). Lab lab teve seu conteúdo citoplasmático bastante corado e apresentou grânulos em maior número e menor tamanho (**Figura 3**). Os citoplasmas das células cotiledonares de Mucuna foram intensamente corados chegando a camuflar os grânulos não corados (**Figura 4**).

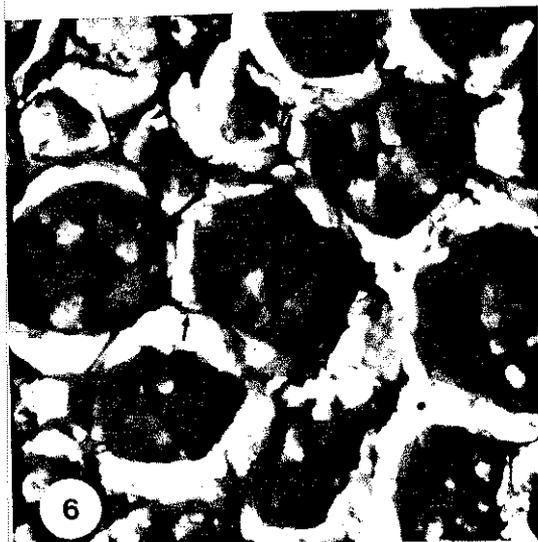
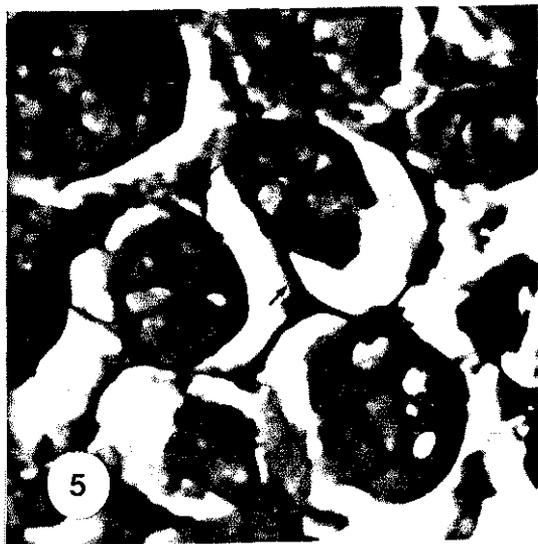
Os materiais fixados em EA mostraram uma maior contração do conteúdo citoplasmático e uma menor afinidade pela safranina (dados não apresentados).

2.2. Polissacarídeos.

Os materiais corados com PAS foram fixados em EA. Embora esse fixador não tenha preservado bem os tecidos, as três espécies mostraram resultado positivo ao método, confirmando a presença de polissacarídeos neutros e glicoproteínas (**Figuras 5 a 7**).



Figuras 2-4: Cortes de cotilédones fixados em PF e corados pela safranina e azul astra. Em todos os casos, nota-se as paredes celulares coradas pelo azul de astra e o conteúdo citoplasmático safranina positivo que circunda inúmeros glóbulos não corados (*). Guandu (2). Lab lab (3). Mucuna (4). Aumento: 420 x.



Figuras 5-7: Cortes corados pela reação do PAS em materiais fixados pelo EA para Guandu (5), Lab lab (6) e Mucuna (7). São evidenciadas as paredes celulares (→) e o material citoplasmático. Em todos os casos, houve uma contração dos citoplasmas em relação às paredes. Aumento: 420 x.

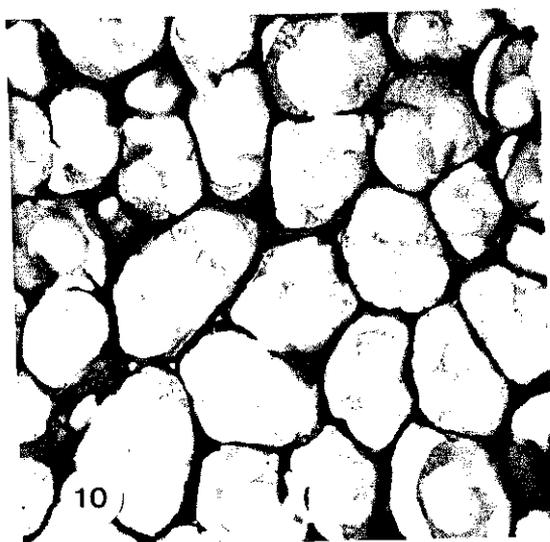
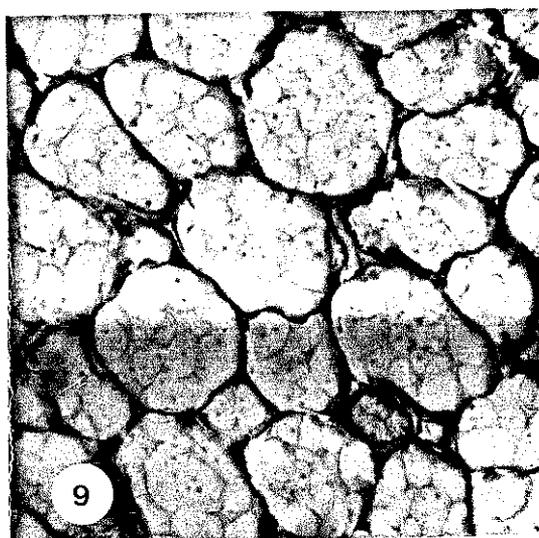
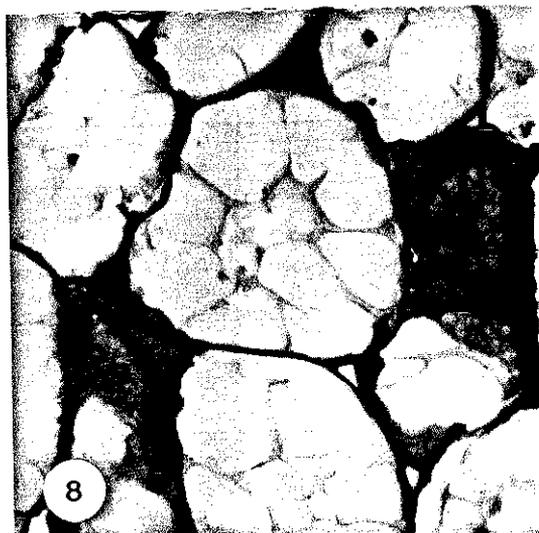
As paredes celulares foram intensamente coradas. Quando coradas com AT pH 4,0, as três espécies apresentaram metacromasia nas paredes celulares (**Figuras 8 a 10**). Aparentemente a metacromasia é menos acentuada em *Lab lab*. Em todas as espécies pode ser observada a presença de plasmodesmos. O conteúdo citoplasmático foi levemente corado, principalmente em *Mucuna* e nos limites dos grânulos não corados por este método.

As **figuras 11 a 13** mostram os resultados obtidos com o AA em pH 1,0, indicando a presença de polissacarídeos sulfatados. Os materiais corados pelo AA pH 2,5 apresentaram-se um pouco mais corados (dados não apresentados). Esses polissacarídeos estão concentrados nas paredes das células cotiledonares.

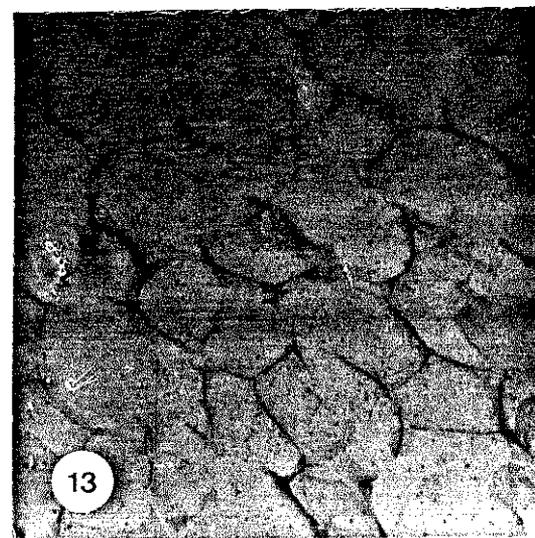
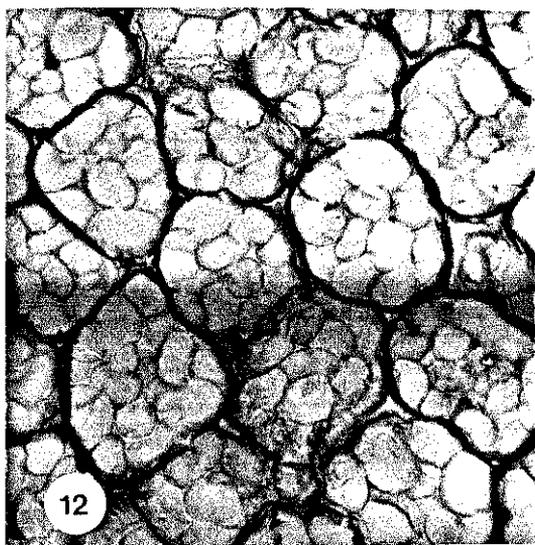
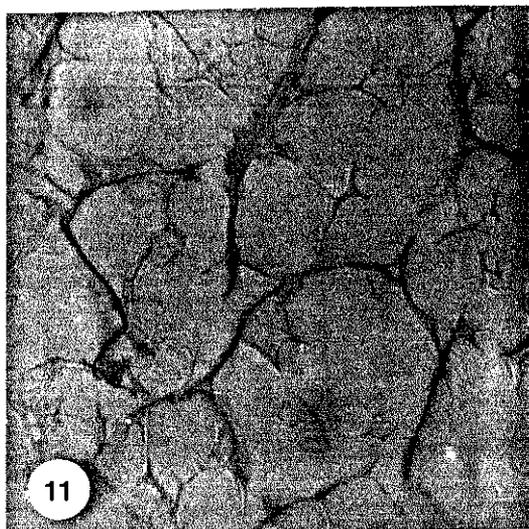
Observações em microscopia de polarização mostraram que os cotilédones exibiam formações de Cruz de Malta (**Figuras 14 a 16**), que caracteriza a presença de amido. É notável também a birrefringência das paredes celulares.

2.3. Material Protéico.

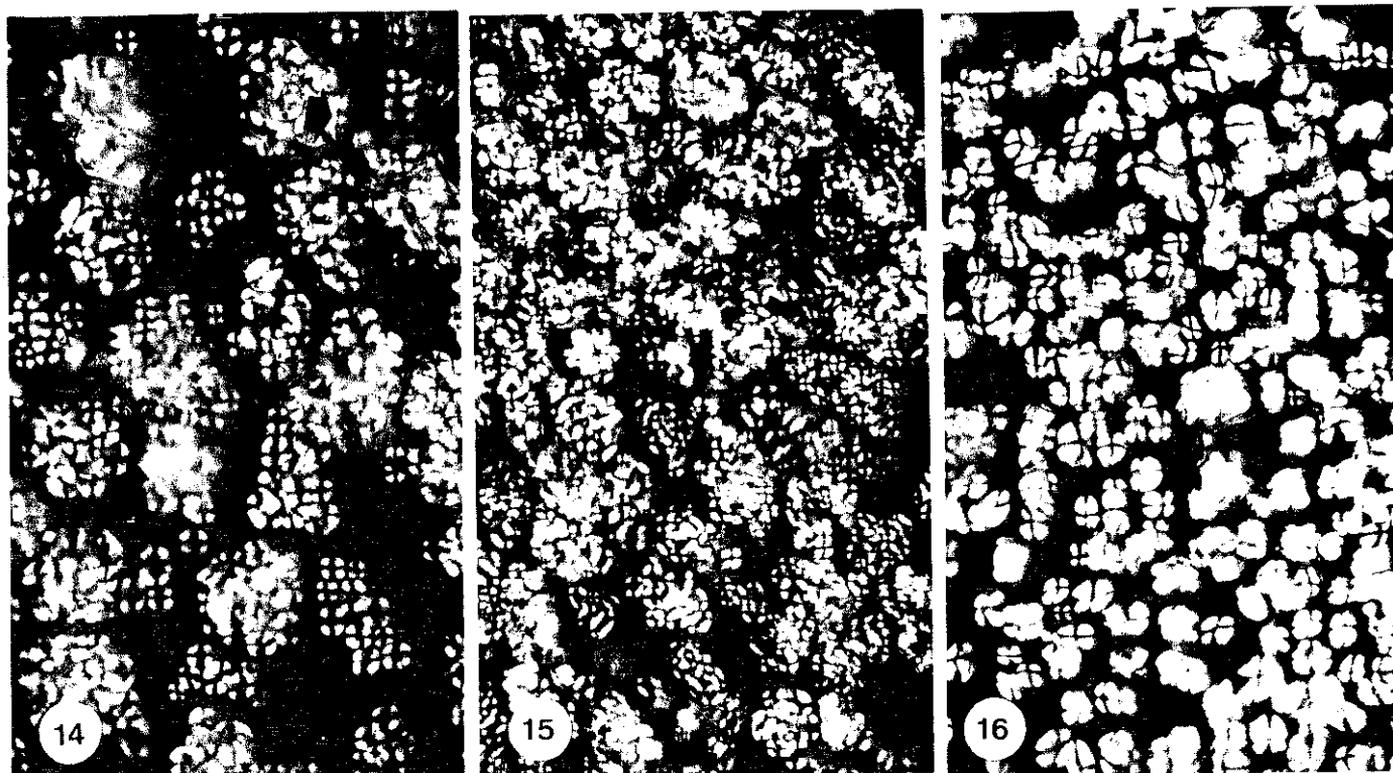
As três espécies apresentaram um conteúdo protéico bastante corado pelo XP pH 2,5 (**Figuras 17 a 19**). O material protéico foi corado em vermelho pode ser notado envolvendo grânulos não corados onde estão as reservas de carboidratos das sementes. Mais uma vez pode ser observada maior quantidade de grânulos em *Lab lab* (**Figura 18**) do que *Guandu* (**Figura 17**) e *Mucuna* (**Figura 19**).



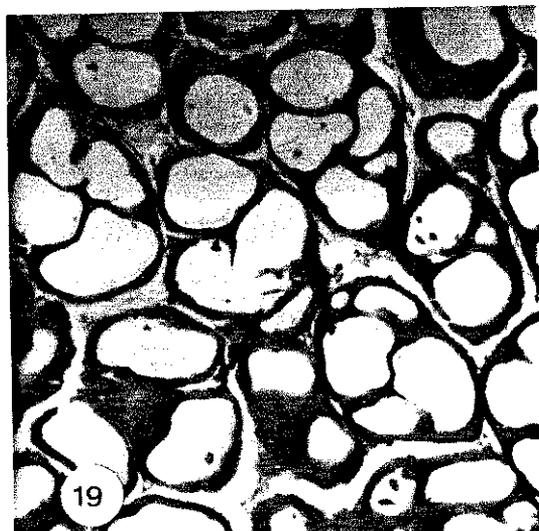
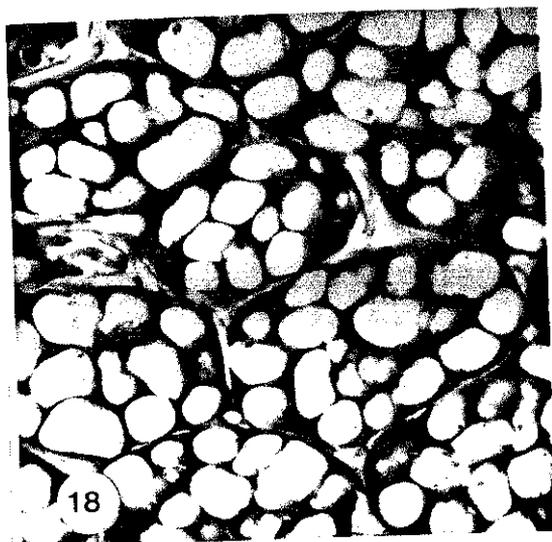
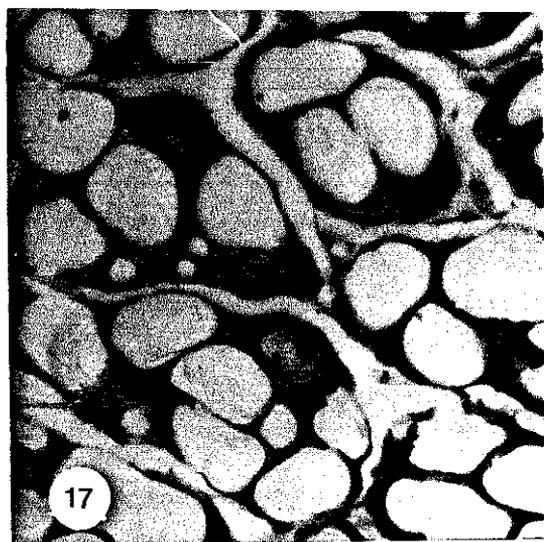
Figuras 8-10: Resultados obtidos com AT pH 4,0 em cortes de cotilédones fixados em PF. Esta coloração mostrou as paredes celulares metacromáticas e citoplasma com coloração menos intensa, sendo um pouco mais evidente em Mucuna e na região limítrofe dos grãos de amido. Guandu (8), Lab lab (9) e Mucuna (10). Aumento: 420 x.



Figuras 11-13: Cortes de cotilédones fixados em EA após coloração com AA a pH 1,0. As paredes celulares das três espécies analisadas estão coradas. Guandu (11), Lab lab (12) e Mucuna (13). Aumento: 420 x.



Figuras 14-16: Cortes manuais e a fresco dos cotilédones de Guandu (14), Lab lab (15) e Mucuna (16) vistas em microscópio de polarização com analisador e polarizador cruzados. Pode ser notada a presença de grãos de amido, maiores e em menor número em Guandu e Mucuna. As paredes celulares (■) também são evidenciadas, devido a birrefringência de seus biopolímeros. Aumento: 130 x.



Figuras 17-19: Cortes de cotilédones corados pelo XP a pH 2,5 após fixação em PF. O material protéico foi corado em vermelho e se apresenta disperso por todo o citoplasma, envolvendo os grãos de amido (★). Uma estrutura mais globular do material XP-positivo é notada apenas em Mucuna. Guandu (17), Lab lab (18) e Mucuna (19). Aumento: 420 x.

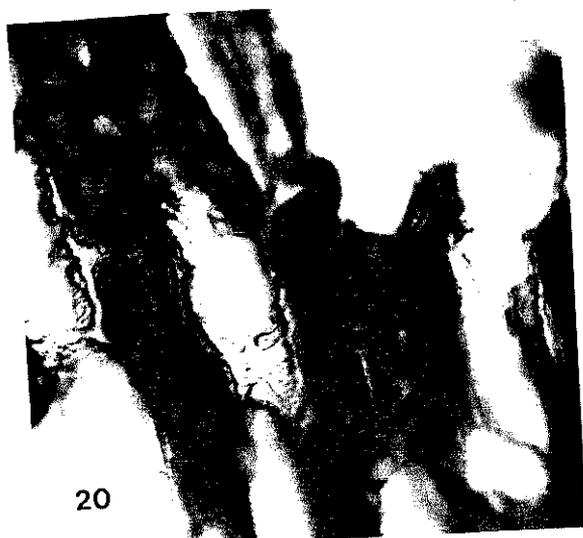
2.4. Lipídios.

A coloração com Sudan Black (**Figuras 20 a 22**) revelou maior quantidade de lipídios em Mucuna (**Figura 22**) e isso foi confirmado no método de extração e dosagem dessas moléculas. O material hidrofóbico está situado no citoplasma das células cotiledonares, envolvendo os grânulos de amido, como já descrito para SA e XP. Em Mucuna pode ser notada maior coloração nos envoltórios dos corpos proteicos (**Figura 22**).

3. Análise "in situ" dos Tegumentos.

Na coloração dos tegumentos pelo o método do PAS as três espécies apresentaram uma forte reação positiva, indicando a presença de polissacarídeos neutros. Em Guandu e Lab lab a camada de osteoescleréides se mostrou mais evidente (**Figuras 23 e 24**) quando comparado com Mucuna (**Figura 25**) onde essas estruturas não foram bem preservadas. Em Guandu e Lab lab a coloração foi mais homogênea em toda a casca desde a camada paliçada até a camada de osteoescleréides. Em Mucuna a coloração foi menos intensa na região apical da paliçada (**Figura 25**).

A coloração com AT pH 4,0 indicou um comportamento diferenciado das três espécies. Em Guandu a metacromasia foi mais evidente nos 2/3 inferiores das células, a partir da região basal. A porção mais apical das células apresentou uma coloração mais azulada (**Figura 26**). Em Lab lab, pode ser notada uma menor



20

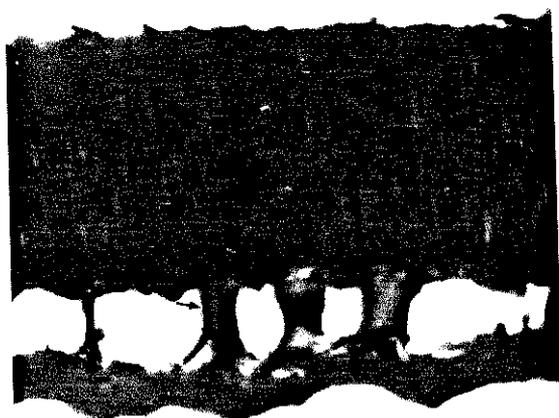
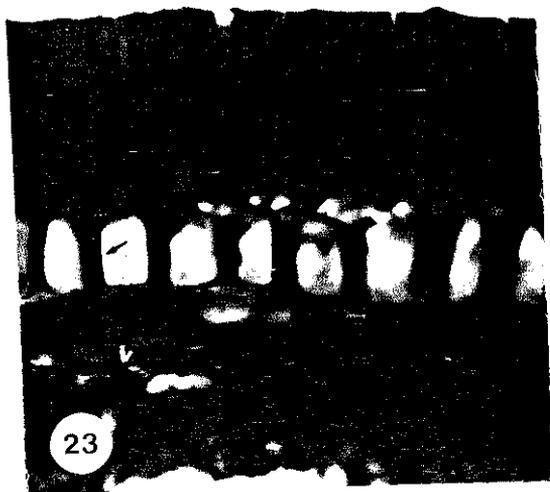


21

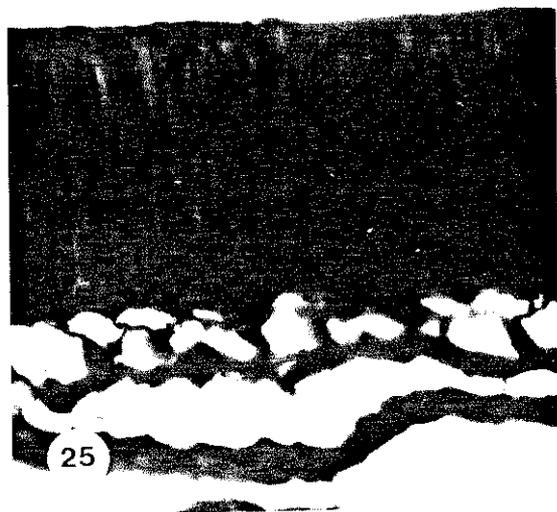


22

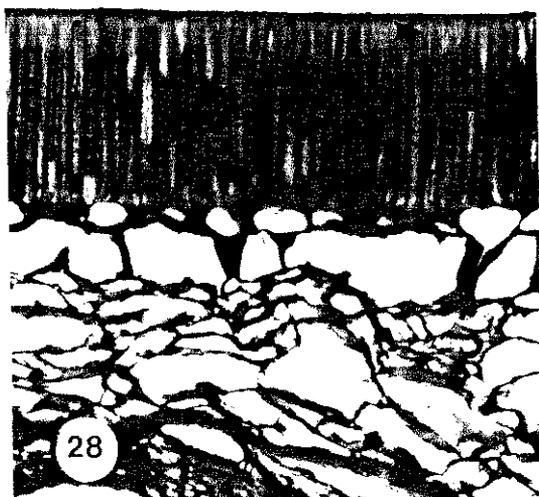
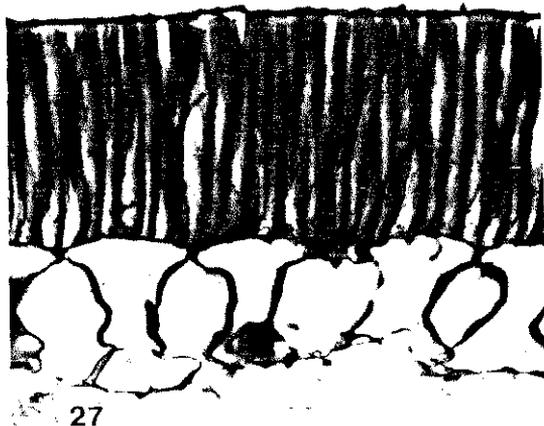
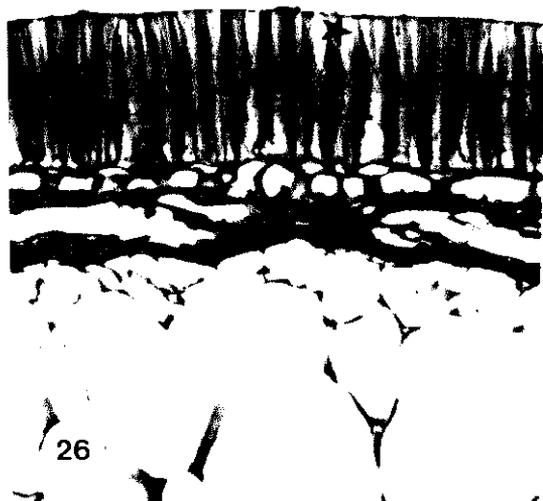
Figuras 20-22: Cortes de cotilédones corados pelo Sudan Black após corte em congelação. O material hidrofóbico aparece corado em negro. Guandu (20), Lab lab (21) e Mucuna (22). Nota-se uma maior coloração nas células de Mucuna em relação as duas outras espécies, seguida pelo Guandu. A visualização dos limites dos glóbulos de proteínas é mais facilmente obtida em Mucuna que nas demais espécies. Aumento :420 x.



24



Figuras 23-25: Cortes transversais dos tegumentos submetidos à reação do PAS. Todos os tegumentos estão fortemente corados. Guandu (23). Lab lab (24). Mucuna (25). Em Guandu e Lab lab houve uma melhor preservação dos osteosclerídeos (→) os quais estão bastante corados. Em Mucuna, a região apical da paliçada (★) foi menos corada que o resto das paredes celulares. Aumento: 420 x.



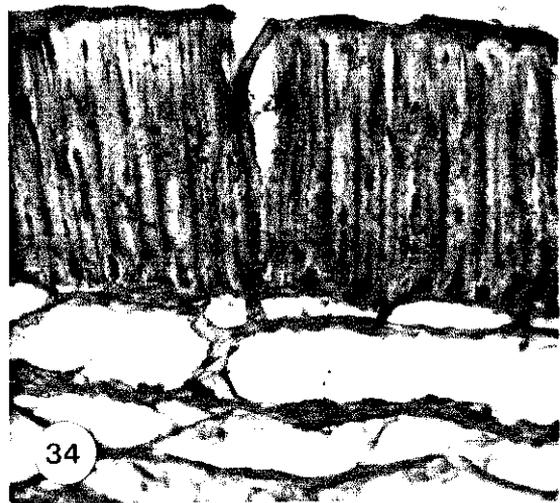
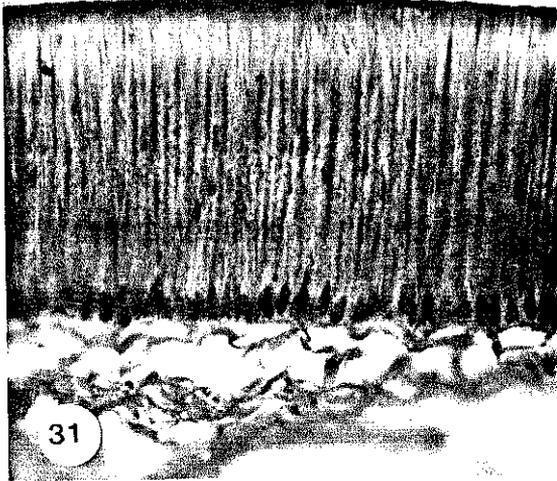
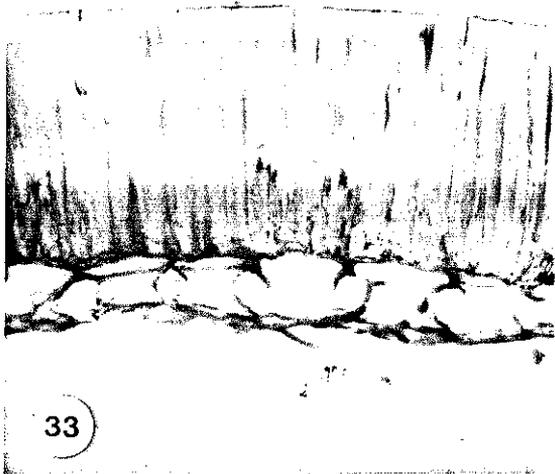
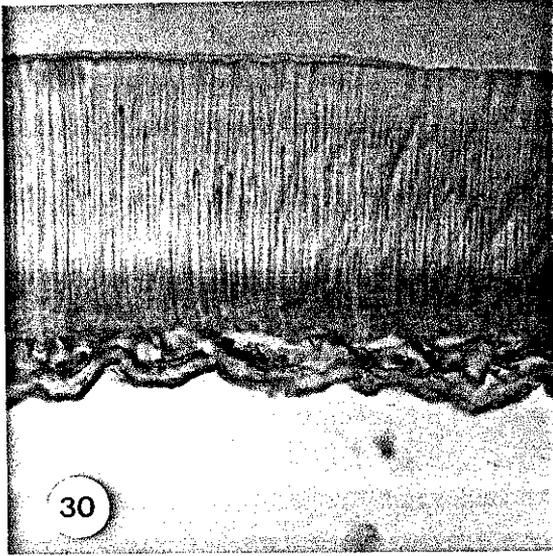
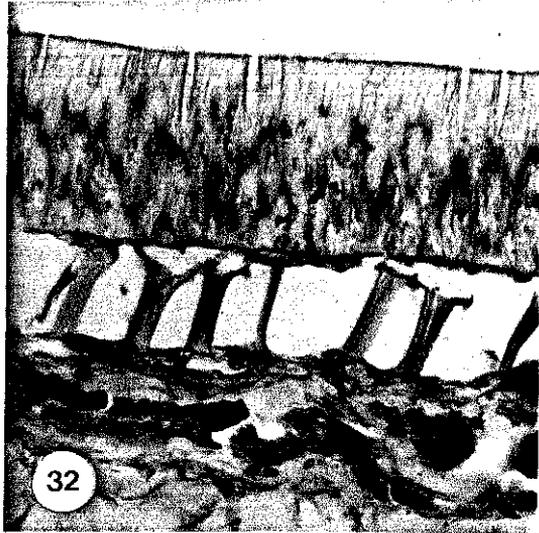
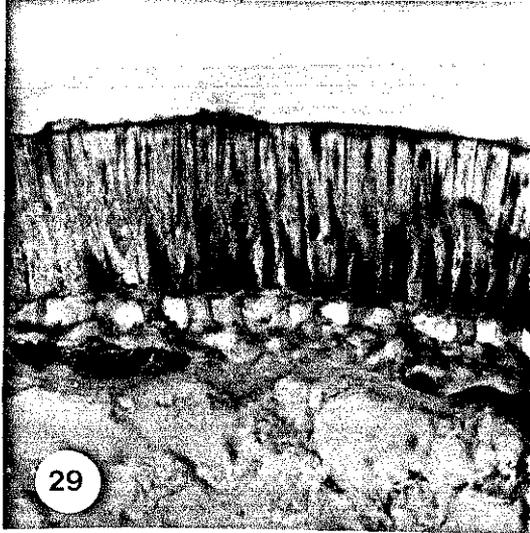
Figuras 26-28: Cortes transversais dos tegumentos após coloração pelo AT pH 4,0. Ocorreu metacromasia das paredes sendo mais evidente em Guandu (26) que em Lab lab (27) e também intensa em Mucuna (28). Guandu e Mucuna apresentam a região apical da paliçada menos corada (★) em contraste com a maior homogeneidade das células paliçádicas de Lab lab. Aumento: 420 x.

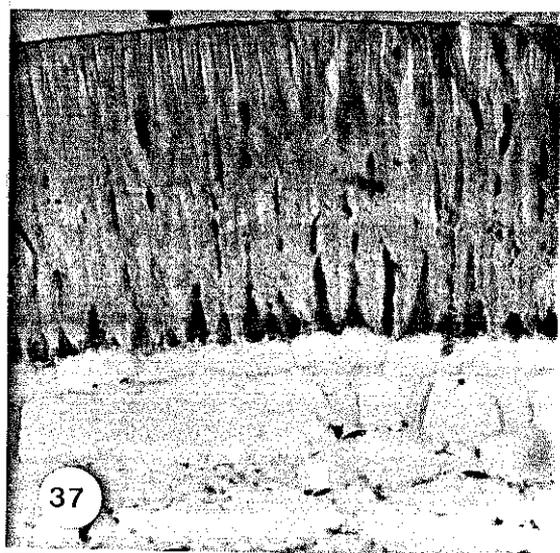
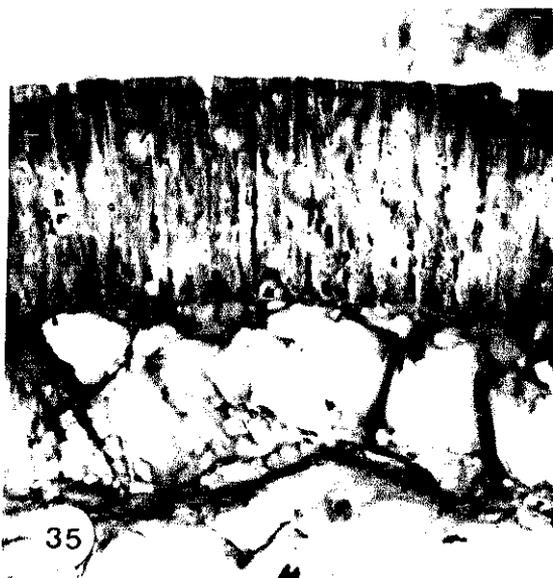
metacromasia e uma maior homogeneidade na coloração (**Figura 27**). Mucuna apresentou uma metacromasia menos intensa ao nível da paliçada em relação as paredes das células de osteoesclereídeos e do parênquima tegumentar. Além disso, a região apical se apresentou menos e mais homogeneamente corada que as demais. Na porção basal, pode ser observado o acúmulo de material de cor marrom (**Figura 28**).

As três espécies apresentaram pouca coloração com AA pH 1,0 (**Figuras 29 a 31**). Em Guandu, há uma predominância dos polissacarídeos na região mais apical da camada paliçádica (**Figura 29**). Contrariamente, em Lab lab observou-se uma maior coloração nas regiões mais basais e o mesmo ocorreu com Mucuna (**Figuras 30 e 31** respectivamente). A região de células parenquimáticas apresentou-se mais corada do que a paliçada nos três casos analisados. Em Guandu e Mucuna, aparece uma coloração marrom que se deve provavelmente a pigmentos da casca. Em ambos os casos esta pigmentação é predominante na região basal da paliçada, principalmente no caso de Mucuna.

Nas três espécies, houve maior coloração por AA pH 2,5, e a pigmentação marrom ficou menos aparente. A casca de Guandu apareceu mais corada na região basal (**Figura 32**) enquanto que em Lab lab (**Figura 33**) a coloração foi mais homogênea ao longo dessas células, exceto na região bem próxima do seu ápice. Em Mucuna (**Figura 34**), houve uma maior coloração no terço apical da paliçada.

As cascas de Guandu e Lab lab, (**Figuras 35 e 36**) apresentaram uma boa reação ao XP demonstrando a presença de proteínas. Já em





Figuras 35-37: Cortes transversais dos tegumentos após coloração com XP pH 2,5.

Em Guandu (35) pode ser visto um maior acúmulo de material corado na porção apical da paliçada (→). Enquanto que em Lab lab (36). A coloração foi ligeiramente maior nas extremidades das células (↘). Em Mucuna (37) as paredes celulares praticamente não foram corados pelo XP. Aumento: 420 x.

Mucuna (**Figura 38**), houve apenas uma leve coloração ao nível do tegumento. Pode ainda ser observado um maior acúmulo de material XP-positivo no ápice das células da paliçada em Guandu (**Figura 35**).

A reação com ferricianeto férrico (**Figuras 38 a 40**) revelou uma maior deposição de corante nas cascas de Mucuna (**Figura 40**) em relação as demais. Guandu e Mucuna tiveram suas regiões basais mais coradas (**Figura 38 e 40**). Em Lab lab (**Figura 39**) quase não houve reação positiva, exceto na porção mais central e basal da paliçada.

O resumo dos resultados das diversas colorações realizadas ao nível dos tegumentos, estão representados na **Tabela 1**.

Ao microscópio de polarização pode ser observado a forte birrefringência das paredes celulares das camadas paliçádicas e dos osteoesclereídeos (**Figuras 41 a 43**). Novamente em Mucuna, os corpos marrons também detectados pelos outros métodos, foram evidenciados com uma diminuição da birrefringência nesses locais (**Figura 43**). As paredes celulares da camada parenquimática apresentaram-se também birrefringentes, mas também mais finas que aquelas da paliçada.

Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de varredura encontram-se nas **Figuras 44 a 46**. Podem ser notadas em todos os casos as células da paliçada com suas paredes celulares espessas e fibrilares. Essas camadas possuem células com cerca de 100-110 μm de comprimento para Guandu e Lab lab e cerca de 130-140 μm para Mucuna. Na região dos osteoesclereídeos pode ser vista sua forma colunar característica. Essas células apresentam comprimentos maiores para Mucuna e Lab lab, entre 40 e 50 μm , seguidas do Guandu, com cerca de 25-35 μm .

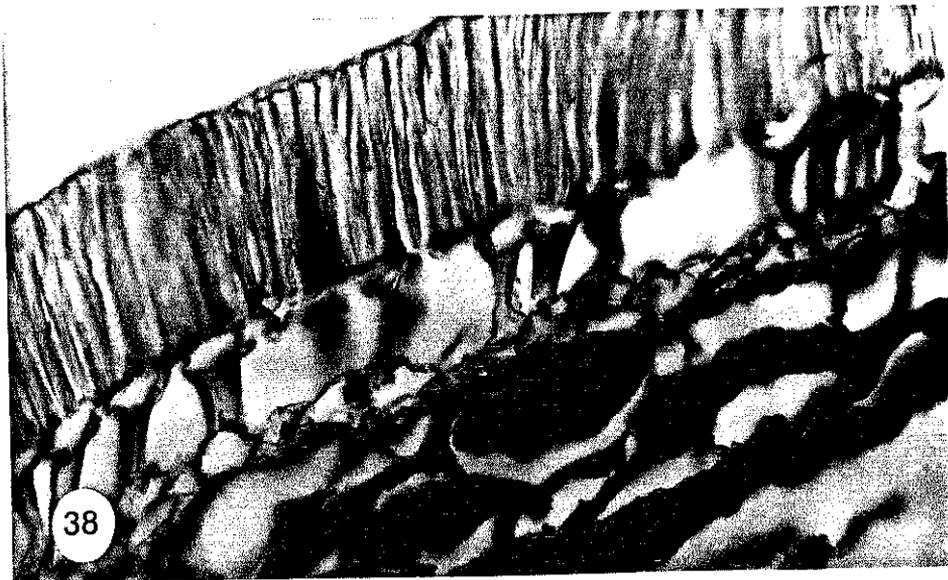
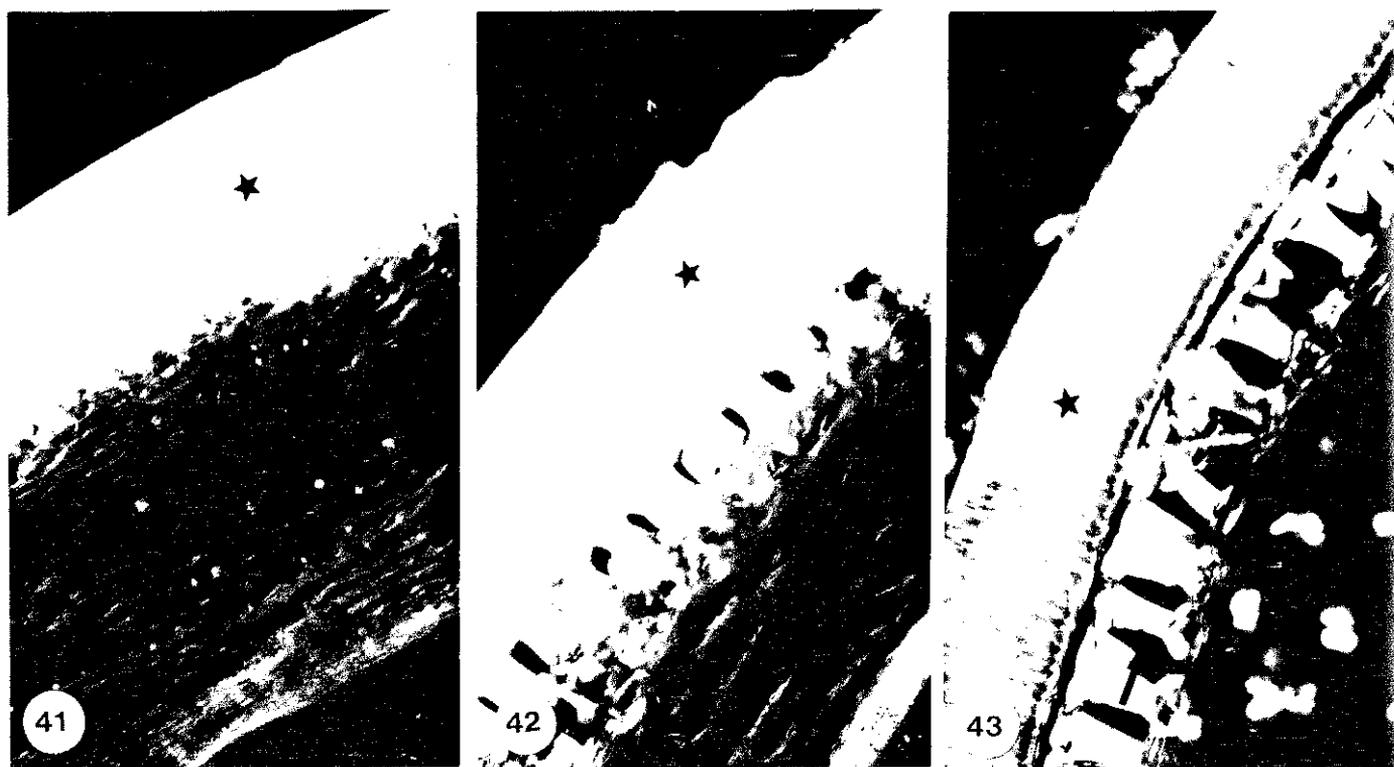


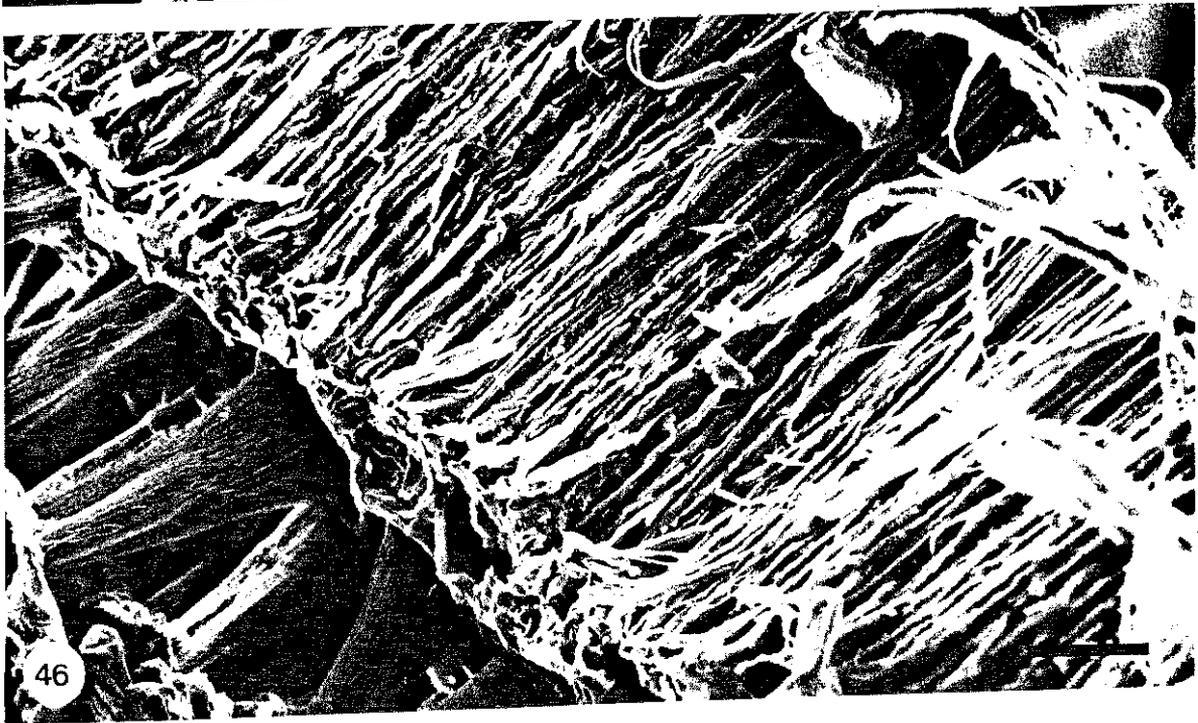
FIGURA 1: Resumo dos resultados obtidos ao nível dos tegumentos de Guandu, Lab lab e Mucuna.

MODO	ESPÉCIE	Guandu			Lab lab			Mucuna		
		BASAL	CENTRAL	APICAL	BASAL	CENTRAL	APICAL	BASAL	CENTRAL	APICAL
AS		+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 3
T pH 4,0		+ 4	+ 4	+ 3	+ 3	+ 3	+ 4	+ 4	+ 4	+ 3
A pH 1,0		+ 1	+ 1	+ 2	+ 1	+ 1	+ 2	+ 2	+ 2	+ 1
A pH 2,5		+ 3	+ 3	+ 1	+ 1	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2	+ 3
P pH 2,5		+ 2/+ 1	+ 1	+ 3	+ 2	+ 1	0	0	0	0
ERRICIANETO FÉRRICO		+ 2	+ 2/0	0	+ 1/0	+ 1	0	+ 4 / +3	+ 4 / +3	+ 2

Resultados arbitrários: +4 coloração intensa; praticamente não corado.



Figuras 41-43: Cortes transversais a fresco dos tegumentos, observados ao microscópio de polarização. Notar a forte birrefringência da paliçada (★) das três espécies analisadas assim como a camada de osteosclereídeos (◄). Guandu (41), Lab lab (42) Mucuna (43). Parênquima tegumentar (✱). Aumento: 130 x.



A camada parenquimática (visualizada nas Figuras 44 a 46) apresentam cerca de 200 μm para Mucuna e Guandu e 150 μm para Lab lab.

4. Extrações e Dosagens.

A principal reserva das sementes analisadas é o amido, seguido das proteínas. Nas dosagens de açúcares, o amido representou a maior porcentagem. Em Guandu essa reserva apresentou seus maiores valores, atingindo mais de 50% da sua matéria seca enquanto que Mucuna apresentou os menores valores (40%). Os níveis de polissacarídeos solúveis em água (WSP) e polissacarídeos livres foram baixos em todas as espécies analisadas (Tabela 2).

Nas dosagens de proteínas, foram obtidos valores semelhantes para Guandu e Mucuna que apresentaram 19,1% e 17,4% da MS, respectivamente. Em Lab lab foram obtidos valores superiores e que representam cerca de 26% da matéria seca dos cotilédones (Tabela 2).

Lipídios foram detectados em pequenas quantidades (Tabela 2). Em termos dessa reserva, Guandu e Lab lab apresentam a mesma quantidade, 13,5 e 13,6 mg/g de MS respectivamente. Mucuna apresentou uma quantidade maior 18,2mg/g de MS.

TABELA 2: Resultados das dosagens de lipídios, proteínas e carboidratos das sementes de Guandu, Lab lab e Mucuna.

RESERVA	GUANDU			LAB LAB			MUCUNA		
	mg/g de MF	mg/g de MS	%	mg/g de MF	mg/g de MF	%	mg/g de MF	mg/g de MS	%
lipídios	11,4	13,5 b	1,4	12,4	13,6 b	1,4	17,1	18,2 a	1,8
proteínas	161,7	191,1 b	19,1	233,0	256,3 a	25,6	162,8	173,4 b	17,4
carboidratos			64,2			57,4			47,3
monossacarídeos	23,7	28,0 a	2,8	18,4	20,2 a	2,0	21,6	23,0 a	2,3
WSP	49,7	58,8 a	5,9	21,4	23,5 b	2,4	58,8	56,2 a	5,6
Amido	469,2	554,6 a	55,5	481,7	529,9 a	53,0	370,3	394,4 b	39,4

Os valores representam a média de três repetições. Todos os desvios padrão obtidos foram menores do que 10% dos valores das médias, exceto para os monossacarídeos onde esses valores são em torno de 15%. Numa mesma linha, valores que apresenta a mesma letra não são diferentes ao nível de $P = 0,01$.

5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS.

Os resultados obtidos em SDS-PAGE (Figura 47) mostraram uma grande população de proteínas nas três espécies estudadas. Nas amostras não contendo Me ("slots" 6 a 8) pode ser notada uma certa quantidade de proteínas que não penetraram no gel, já na presença desse agente redutor este não ocorre ("slots" 2 a 4)

As proteínas mais proeminentes entre as três espécies estão em torno de 100 e 50 ^{kDa} kDa. Em Guandu as proteínas mais evidentes são de 100 e 66 ^{kDa} kDa ("slots" 2 e 6). Várias proteínas podem ser vistas acima de 116 ^{kDa} kDa em Guandu sem Me ("slot" 6) e quatro proteínas entre 50 e 19 ^{kDa} kDa ("slot" 2) que aparecem pouco evidentes nas outras espécies. Uma proteína de 116,5 ^{kDa} kDa aparece somente em Guandu com e sem Me. Em Lab lab é característica a proteína de 45 ^{kDa} kDa, que está mais proeminentemente nos "slots" com e sem Me. ("slots" 3 e 7, respectivamente). Outras duas proteínas mais evidentes em Lab lab são as de 92 e 68 ^{kDa} kDa. Mucuna apresenta uma proteína com 68 ^{kDa} kDa bastante evidente. Também outras três proteínas de menor peso molecular são vistas mais proeminentes em Mucuna do que nas outras espécies: uma com 36,5, outra com 27,5 e a última com 18,5 ^{kDa} kDa ("slots" 4 e 8). Mucuna e Lab lab apresentam uma proteína de 113,5 ^{kDa} kDa que não aparece em Guandu.

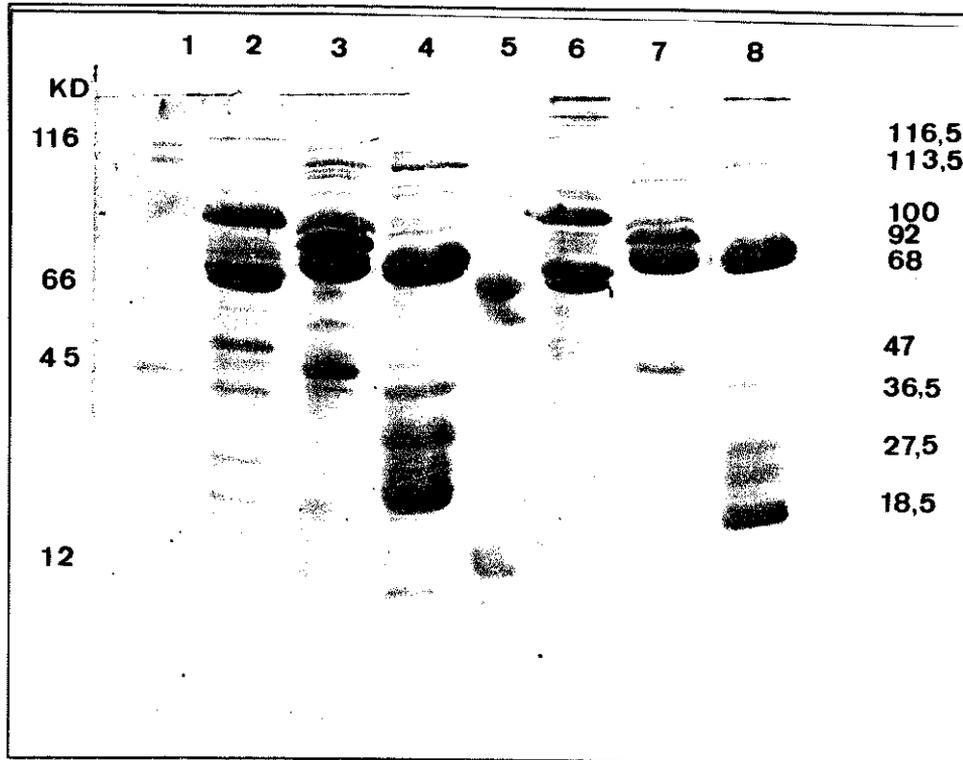


Figura 47: SDS-PAGE (12,5% acrilamida) dos extratos das sementes de Guandu, Lab lab e Mucuna. 1- padrão de peso molecular (β -galactosidase-116 ^{kDa} KDa; fosforilase 97 KDa; albumina 45 KDa). 2- Guandu com Me, 3- Lab lab com Me; 4-Mucuna com Me; 5- padrão de peso molecular (BSA 66 KDa e Citocromo C 12 KDa); 6- Guandu sem Me; 7- Lab lab sem Me; 8- Mucuna sem Me. Condições: 15 mA/2:30 h. Coloração Coomassie Blue.

6. Análise dos Açúcares presentes em Cotilédones e Tegumentos.

Os resultados obtidos para os açúcares dos cotilédones após hidrólise ácida são mostrados na **Tabela 3**. Valores mais altos foram obtidos para Guandu (54%) seguido de Lab lab (46%) e Mucuna (40%) em relação a matéria seca. Os conteúdos de galactose e arabinose foram significativos sendo maiores em Mucuna do que nas outras espécies. Apenas Guandu e Lab lab apresentaram um conteúdo mensurável de xilose. Os maiores valores foram obtidos para a glicose que foi superior para Guandu (464 mg/g de MS) seguido por Lab lab com 412 mg/g de MS. Mucuna apresentou o valor mais baixo, com 318 mg/g de MS (**Tabela 3**).

As análises dos açúcares presentes nos tegumentos das três espécies estudadas encontram-se descritas na **Tabela 4**. Pode ser notada uma predominância de glicose e um conteúdo baixo de ramnose e manose para as três espécies. Arabinose representou entre 8 e 10% do total de açúcares, com um conteúdo porcentual ligeiramente menor em Guandu (8,1%) do que em Lab lab (9,4%) e Mucuna (8,8%). Entretanto, as quantidades desse açúcar são as mesmas para as três espécies. O conteúdo de xilose foi progressivamente maior a partir do Guandu (110mg/g de MS), Lab lab (141 mg/g de MS) e Mucuna (149mg/g de MS). Para glicose, Guandu apresentou a maior quantidade (466 mg/g de MS) não havendo diferença entre Lab lab (351mg/g de MS) e Mucuna (331 mg/g de MS) desse açúcar (**Tabela 4**).

TABELA 3: Valores obtidos nas análises dos açúcares neutros em cotilédones de Guandu, Lab Lab e Mucuna.

AÇÚCAR	GUANDU			LAB LAB			MUCUNA		
	mg/g de MF	mg/g de MS	%	mg/g de MF	mg/g de MS	%	mg/g de MF	mg/g de MS	%
Ramnose	TC	TC	-	TC	TC	-	TC	TC	-
Fucose	TC	TC	-	TC	TC	-	TC	TC	-
Arabinose	22	26	4,8	16	18	3,8	32	34	8,6
Xilose	7	8	1,5	3	3	0,6	TC	TC	-
Manose	4	5	0,9	3	3	0,6	4	4	1,1
Galactose	34	40	7,4	24	26	5,8	39	42	10,5
Glicose	393	464	85,4	373	412	89,2	297	318	79,8
TOTAL	460	544	100	419	462	100	372	398	100
%	46	54,4		46	54,4		37,2	39,8	

TC = traços. Os valores representam a média de tres dosagens.

ABELA 4: Valores obtidos através da análise dos açúcares neutros e ácidos em tegumentos de Guandu, Lab Lab e Mucuna.

AÇÚCAR	GUANDU			LAB LAB			MUCUNA		
	mg/g de MF	mg/g de MS	%	mg/g de MF	mg/g de MS	%	mg/g de MF	mg/g de MS	%
Ramnose	2	2	0,3	3	3	0,6	3	3	0,6
Fucose	TC	TC	-	TC	TC	-	TC	TC	-
Arabinose	45	53	8,1	49	54	9,4	45	48	8,8
Xilose	93	110	16,8	128	141	24,6	140	149	27,4
Manose	4	5	0,7	2	2	0,4	2	2	0,4
Galactose	14	17	2,5	19	21	3,7	11	12	2,2
Glicose	395	466	41,4	319	351	61,3	310	331	60,7
TOTAL	553	653	100	520	572	100	511	545	100
Açúcares ácidos	126	149		107	118		141	151	
TOTAL	682	802		627	690		652	696	
%	68,2	80,2		62,7	69		65,2	69,6	

TC = traços. Os valores representam a média de tres dosagens.

DISCUSSÃO

Com a finalidade de melhor acompanhar as discussões aqui apresentadas são esclarecidos em ANEXO, (vide página 69), os mecanismos de ação dos corantes empregados.

1. Cotilédones.

Guandu, Lab lab e Mucuna produzem sementes não endospermicas. Assim, todas as suas reservas estão concentradas nos cotilédones e eixos embrionários. As sementes analisadas apresentaram o amido e proteínas como principais materiais de estocagem. Entretanto, houve reação positiva ao Sudan Black, cuja característica é a de interagir com o material hidrofóbico presente (MAIA, 1979). A pouca quantidade de lipídios detectada por esse método foi confirmada pela extração com MCW, inclusive quando uma maior quantidade foi observada em Mucuna.

Nas sementes de Guandu e Lab lab, foram encontrados cerca de 1,4% de lipídios. ANELLI & NUTI (1978) obtiveram uma taxa superior (3%) para Lab lab (cultivar rongai). Segundo a Academia Norte Americana de Ciências (NAS) 1979, os grãos secos dessa espécie contém 1,1% de óleo o que sugere que a variedade rongai apresenta um maior teor de lipídios.

A análise dos óleos presentes em Mucuna anã (ULIAN, 1981) revelou um valor de 12,4%. SOUZA (1987) obteve um valor de 6,88% nas dosagens enquanto que os valores obtidos no presente trabalho para essa espécie foram baixos (2%). Esses autores também

encontraram amido e proteína como as principais reservas das sementes de *Mucuna*. Outro fator a ser destacado é a diferença entre os valores obtidos para diferentes variedades o que poderia justificar os resultados encontrados.

A fixação do material com etanol e ácido acético provocou uma contração drástica do material citoplasmático em relação às paredes celulares sendo utilizada somente nos casos absolutamente necessários como na reação do PAS.

O uso de ácido fluorídrico para o amolecimento de tecidos lenhosos é uma prática antiga e comum (JOHANSEN, 1940). Entretanto, os resultados demonstraram que ele pode alterar a sensibilidade dos grãos de amido ao ataque do ácido periódico na reação do PAS, uma vez que não houve a eficiência normal do método para evidenciar esse carboidrato. Concentrações de HIO_4 de 0,5% e durante 9 min. foi sugerida por LISON (1960). O tempo utilizado foi o mesmo seguido para *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata*. (CORTELAZZO, 1992) e *Phaseolus vulgaris* (BEGNAMI, 1991) que são leguminosas da mesma sub-família do Guandu, Lab lab e *Mucuna*. Uma maior sensibilidade intrínseca dos grãos de amido dessas espécies não pode ser descartada. Assim, para obter melhores resultados, deverão ser realizados estudos com diferentes tempos de oxidação e diferentes tempos de permanência em ácido fluorídrico elucidando esse aspecto.

A confirmação de que os grânulos presentes nas células cotiledonares são grãos de amido, é feita através do uso do microscópio de polarização. Os grãos de amido são semi-cristalinos e exibem birrefringência em forma de cruz de malta sob luz

polarizada (BANKS & MUIR, 1980; VIDAL, 1987), devido a disposição das moléculas de amilose e amilopectina (CORTELAZZO, 1992). Em Lab lab pode ser notada uma quantidade maior de grãos de amido de menor tamanho. Já em Guandu, aparentemente pode ser notada uma maior quantidade de grãos que em Mucuna, com tamanho também maior do que em Lab lab mas, com formato mais globular. Essa análise comparativa, sugere um maior conteúdo de amido em Guandu do que em Mucuna o que foi confirmado nos métodos de extração e dosagem. No caso de Lab lab, o tamanho diferente dos grãos dificulta uma estimativa em relação as duas outras espécies. Entretanto, as três espécies analisadas apresentaram um grande conteúdo desse polissacarídeo.

Principalmente em cereais, o amido chega a representar mais de 60% da matéria seca da semente como é o caso em *Hordeum vulgare* com 64% (KREIS & DOLL, 1980), *Zea mays* com 67% (TZAI & NELSON, 1966; GENTINETTA & SALAMINI, 1979), *Oryza sativa* com 77% (SINGH & JULIANO, 1977) e *Triticum aestivum* com 70% (JENNINGS & MORTON, 1963). Essas quantidades podem variar entre os diferentes cultivares de uma mesma espécie segundo a capacidade do tecido na conversão de sacarose em amido. Essa capacidade em geral é inversamente associada ao conteúdo de glóbulos de proteínas presentes (JENNER & RATHJEN, 1978). Outros fatores podem também afetar o desenvolvimento e estocagem de grãos de amido. Há uma relação direta entre a quantidade de fotossintatos com o número de células produzidos e conseqüentemente com a quantidade de amido estocada na semente (BROCKLEHURST & EVERS, 1977; BROCKLEHURST *et al.*, 1978).

Em legumes, o amido pode atingir mais de 50% da matéria seca em *Pisum sp* e *Vicia faba* (HALMER, 1985), *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* (CORTELAZZO, 1992). Variedades de *Vigna unguiculata* apresentam entre 50 a 67% de amido em relação a matéria seca da semente. O amido é a principal reserva de inúmeros outros legumes (SMITH, 1973; ARORA & DAS, 1976; JENNER, 1982).

Em oleaginosas essa quantidade é normalmente menor, como por exemplo da soja com aproximadamente 10% (YAZOLI-SAMADI *et al.*, 1977). Assim, os valores obtidos estão dentro da faixa de resultados encontrados na literatura para outras espécies vegetais. Nos resultados as dosagens revelaram que em Guandu há um maior conteúdo de amido, seguido de Lablab e Mucuna, sendo esta última com uma quantidade inferior às duas anteriores.

As diferenças obtidas na extração e dosagem (método da antrona) em relação as análises cromatográficas confirmam que todos os métodos de extração e dosagem têm um valor estimativo, mesmo se considerados os métodos enzimáticos de dosagem, mais recentes que o da antrona que data da década de 50 (HAISSIG & DICKSON, 1979; JENNER, 1982). Mesmo assim, em ambos os casos, foi Guandu a espécie mais rica em amido, seguido por Lablab e Mucuna.

As paredes celulares dos cotilédones foram coradas pelo azul astra e também pelo método do PAS devido a presença dos polissacarídeos neutros (celulose principalmente). AT pode corar essas estruturas devido às substâncias pécticas presentes sendo observada metacromasia. A metacromasia ocorre devido a proximidade dos grupos negativos presentes nesses polímeros. Também pelo mesmo motivo, pode ser observada a coloração pelo AA. Entretanto, dada a

intensidade de coloração, é de se supor que a quantidade de pectatos não é muito elevada nas paredes das três espécies ou que os grupos negativos dos mesmos encontram-se fortemente ligados a outras estruturas ou que sejam inacessíveis às moléculas dos corantes.

A coloração pelo AT e AA principalmente, mas também as demais, mostraram uma grande diferença no tamanho das células cotiledonares. Em Guandu elas se mostraram maiores em relação as outras 2 espécies.

Paredes celulares de cotilédones são ricas em xiloglicanos (CARPITA & GIBEAUT, 1993). Entretanto a composição dos açúcares formadores das paredes celulares dos cotilédones ficou comprometida devido a grande quantidade de amido presente nas células. A remoção do amido poderá se feita a fim de possibilitar essa análise. Desse modo, esse estudo complementar e determinará as particularidades existentes ou não nas paredes celulares.

Traços de ramnose e fucose foram determinados nas cromatografias. A xilose pode ser determinada apenas em Guandu e Lab lab. Apesar disso, os resultados sugerem uma maior quantidade desse polissacarídeo nas paredes celulares das duas espécies citadas. Mucuna apresentou uma maior quantidade de galactose, sugerindo uma maior presença de galactomananos nos cotilédones dessa espécie.

Não foi realizada a dosagem de polissacarídeos ácidos nos cotilédones porque a coloração com AA foi fraca e a quantidade de xilose e ramnose foi muito pequena.

A outra reserva mais expressiva encontrada, foi o material protéico. As proteínas foram evidenciadas "in situ" pelo XP a pH 2,5 (VIDAL & PIMENTEL, 1985; CORTELAZZO & VIDAL, 1989; BEGNAMI, 1991). As proteínas de reserva se distribuem por todo o citoplasma das células cotiledonares, circundando os grãos de amido. Não puderam ser notadas visualmente, diferenças de intensidade de coloração, revelando que o teor dessas moléculas não varia muito entre as três espécies. A coloração pelo método do PAS, indicou a presença de glicoproteínas nos corpos protéicos.

Sementes de leguminosas são ricas em globulinas que apresentam duas sub-famílias de proteínas: as leguminas e as vicilinas. Essas proteínas se encontram em organelas denominadas corpos proteicos (PERNOLLET, 1982; 1985). Elas podem ocorrer não só em tecidos diplóides (cotilédones) mas também em tecidos haplóides e triplóides (ALTSCHUL *apud* PERNOLLET, 1978). Ocorrem não só em angiospermas mas também em algumas gimnospermas (CECISH *apud* PERNOLLET, 1978; DURZAN *apud* PERNOLLET, 1978) e em oócitos de animais (ROTH *apud* PERNOLLET, 1978; WARD *apud* PERNOLLET, 1978). Os corpos protéicos nas angiospermas, contém ainda o ácido fítico, cátions, RNAs e enzimas hidrolíticas como proteases, alfa-amilase, etc. (PERNOLLET, 1978; LARKINS, 1981; MURRAY, 1984). As reservas protéicas são degradadas durante a germinação, sendo utilizadas para o crescimento e até mesmo na cadeia respiratória (TOMBS, 1967; CATSIMPOOLAS *et al.*, 1968; GANECH & VENKATARAMAN *apud* CORTELAZZO & VIDAL, 1991). As dosagens do material proteico foi feita segundo (BRADFORD, 1976). Esse método é baseado na interação entre moléculas do Coomassie Blue (corante ácido, como o XP) e os grupos

amino das proteínas. Uma diferença desses grupos (numa proteína básica como as histonas, por exemplo) pode originar resultados errôneos. Além disso, como no método de Lowry, a presença de compostos fenólicos pode alterar os resultados das dosagens (CORTELAZZO, comunicacao pessoal). Sabe-se ainda que o corante pode interagir com aminoácidos hidrofóbicos próximo ao local de ligação comprometendo os resultados obtidos caso a proteína a ser dosada apresente quantidades desse aminoácido muito diferente da soroalbumina bovina (BSA) que é usada como padrão (TAL *et al.*, 1986). Assim, o ideal seria ter uma proteína padrão semelhante aquelas que serão dosadas como proteínas de feijão de porco *2* feijão espada, que foram empregados por CORTELAZZO (1989) como padrões de proteínas. Contudo fica difícil comparar com resultados de outros trabalhos que utilizam o BSA como padrão. Assim sendo decidimos manter neste trabalho o emprego do BSA como padrão de proteínas. Entretanto seus resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para quantidades de até 500 µg/ml de solução. Apesar de todos os inconvenientes do método de Bradford, ele ainda continua a ser bastante utilizado em vegetais (LI *et al.*, 1989; KERBY & SOMERVILLE, 1992; ÇAKMAK *et al.*, 1993; GONZALES *et al.*, 1993).

TEIXEIRA *et al.* (1985), em estudos sobre a composição química de Guandu, obtiveram 23,11 g/100g de proteína seguindo o método de Kjeldahl para dosagem de proteínas. O valor obtido no presente trabalho (19,1 g/100g de MS) apesar de ser um pouco inferior, mostra-se próximo aos obtidos por esses autores. Do mesmo modo, SOUZA *et al.* (1991) constataram um teor de proteínas de 26,7% em

Guandu . Estes mesmos autores fizeram uma avaliação do uso do Guandu na alimentação humana e/ou animal. Mediante os resultados obtidos, foi observado que a leguminosa estudada tem possibilidades de compor a dieta alimentar, com um teor de proteínas nos grãos secos que varia entre 17% a 24%. Esta variação poderia estar relacionada com a época do plantio, local de cultivo e cultivares utilizados (ABRANS apud SOUZA et al., 1991). Analisando quimicamente grãos de Lab lab (cultivar rongai), ANELLI & Nuti (1978) encontraram 28,7% de proteínas. Observaram ainda que, com exceção da metionina, todos os aminoácidos apresentaram concentrações superiores quando comparados com os padrões estabelecidos pela FAO/WHO, 1973. Segundo a Academia Norte americana de Ciências (NAS) os grãos secos de Lab lab contém cerca de 25,5% de proteína, 1,1% de óleo, 69,6% de carboidratos, 9,6% de fibras, 3,6% de cinzas e um balanço satisfatório de aminoácidos, sendo ricos em lisina (6,1%). Os valores encontrados Lab lab neste trabalho, foram de 1,4% de óleos, 57,4% de carboidratos e 25,6% de proteínas o que confirma os resultados existentes para essa espécie.

A digestibilidade "in vitro" das proteínas de Lab lab foi estudada por SGARBIERI (1980) que detectou baixa concentração para o inibidor de tripsina (55,5 UT/mg prot.), verificou ainda que o cozimento em autoclave a 121 °C por 10 minutos, elevou a digestibilidade de 28,3% (grão cru) para 88,2% (grão cozido). SOUZA (1992) apresentou o nível de proteínas em Lab lab em 20,19% e 2,23% para óleo. Também detectou 41,86% de amido, 3,7% de cinzas e 9% de umidade. A digestibilidade in vitro da proteína foi de 42%

e esta taxa é inferior a do feijão comum (55%) (DURIGAN, 1985) e da soja (70%) (LAM-SANCHEZ, 1977). Segundo SOUZA (1992), Lab lab apresentou um bom teor de lisina (5,8%) e baixos níveis de aminoácidos sulfurados (1,14%) o que, segundo LAM-SANCHEZ (1977) é uma característica comum às leguminosas. No entanto níveis inferiores aos obtidos para soja e para o feijão (SOUZA, 1992).

Nas análises em grãos de Mucuna anã feitas por ULIAN (1981) foi obtido os seguintes resultados: proteína: 25,5%; óleo: 12,4%; carboidratos: 8,4%. Em trabalho semelhante, SOUZA (1987) obteve 19,30% de proteína; 6,88% de óleo; 46,7% de amido; 5,35% de fibra; 5,04% de matéria mineral. Em Mucuna, foi encontr^odo 17,4% de proteínas valores que estão abaixo dos citados. As variações encontradas podem ser devido a utilização de diferentes espécies de Mucuna e do fato de que ocorre uma maior quantidade de substâncias não identificadas nessa espécie (ver **Tabela 2**), o que sugere a interferência de outros compostos na análise como por exemplo o ácido tânico, cuja presença foi sugerida nos testes citoquímicos e que deverá merecer estudos complementares.

As globulinas são as proteínas mais abundantes em leguminosas. Leguminas apresentam em geral uma massa molecular aparentemente 300 e 400 ^{kDa} ~~KDa~~. São formadas normalmente por 6 subunidades ácidas (entre 27 e 37 KDa) e 6 básicas (entre 20 e 24 ^{kDa} ~~KDa~~). Possuem menos de 1% de açúcares, na sua maioria neutros. São ricas em ácido aspártico-asparagina, ácido glutâmico-glutamina e arginina. Vicilinas são mais semelhantes entre as diversas espécies e contêm proporcionalmente mais carboidratos que as leguminas. Suas

sub-unidades apresentam em geral massa molecular aparente entre 20 e 53 KDa (DERBYSHIRE *et al.*, 1976).

Os resultados obtidos nas eletroforeses revelaram inúmeras diferenças entre as três espécies. Se considerarmos que a população de vicilinas é mais semelhante entre diferentes espécies (DERBYSHIRE *et al.*, 1976), poderemos supor que neste caso elas apresentam uma massa molecular aparente em torno de 66 a 70 ^{KDa} KDa. Assim as outras vicilinas e/ou leguminas teriam uma massa molecular aparente diferente e poderíamos dizer que a proteína de 100 ^{KDa} KDa é característica para Guandu; que Lab lab é caracterizada pela proteína 45 ^{KDa} KDa enquanto que Mucuna, pelas proteínas de menor peso molecular como por exemplo as de 36,5, 27,5 e 18,5 ^{KDa} KDa. Ao nível taxonômico pode ser especulado e sugerido uma maior proximidade filogenética entre Guandu e Lab lab pois elas apresentaram um perfil eletroforético mais semelhante entre si e bastante diferente daquele apresentado pela Mucuna.

2. Tegumentos.

Anatomicamente, os tegumentos das sementes são formados externamente por uma camada de células alongadas e que podem conter pigmentos. Essas células denominadas paliçádicas são ricas em substâncias pécticas (ROLSTON, 1978). Internamente há uma camada constituída de células colunares ou osteoesclereídeos e camadas de células parenquimáticas comprimidas entre as duas camadas epidérmicas. A camada paliçádica é de grande interesse devido ao

fato de que sua estrutura e composição. Em certas leguminosas duras, é tida como causadora do alto grau de impermeabilidade, afetando em consequência, a capacidade de germinação. A ocorrência de tegumentos extremamente impermeáveis é um dos fatores importantes no retardamento da germinação das sementes, não apenas em leguminosas como ainda de outras angiospermas (TOOLE *et al.*, 1956).

Celulose é um dos principais constituintes das paredes celulares juntamente com os xiloglicanos e as substâncias pécticas (FRY, 1988). Assim, pode ser notada uma intensa coloração das paredes pelo método do PAS em todas as espécies estudadas, principalmente nas células paliçádicas.

A celulose é um homopolissacarídeo formado por glicoses ligadas na posição β 1 \rightarrow 4 (ASPINALL, 1980). As fibrilas de celulose, se associam os xiloglicanos que são polissacarídeos complexos formados por unidades repetitivas contendo glicose 1 \rightarrow 4 ligadas a xilose β 1 \rightarrow 6 que por sua vez podem estar ligadas a galactose que se ligam com alguma frequência à fucose (FRY, 1992; JOSELEAU *et al.*, 1992; RUEL & JOSELEAU, 1993).

A maior parte dos xiloglicanos é sintetizada na porção trans do Complexo de Golgi (DRIOUICH *et al.*, 1993). Os resíduos de galactose mas, principalmente os de fucose, são incorporados já nas vesículas trans-Golgi (ZHANG & STAEHELIN, 1992). Assim, as análises cromatográficas dos tegumentos revelaram um alto teor de xilose (de 17 a 27%, ver **Tabela 4**) confirmando a presença marcante desses açúcares na formação dos xiloglicanos da parede. Um outro açúcar com porcentagens relativas altas foi a arabinose. Arabinanos,

são menos estudados por serem menos abundantes em paredes celulares (ZAWADZKI-BAGGIO *et al.*, 1992).

O outro polissacarídeo complexo e abundante nas paredes celulares é o ácido poligalacturônico/ramnogalacturônico cuja síntese se inicia na porção cis do Complexo de Golgi e nas cisternas medianas onde essas moléculas estão praticamente completas (MOORE *et al.*, 1991).

Ramnose é considerado como um açúcares marcador da presença de substâncias pécticas pois é o único açúcar neutro presente na cadeia principal de ácido poligalacturônico/ramnogalacturônico, substância péctica mais comum nas paredes primárias. Outros açúcares neutros podem fazer parte dessa estrutura mas sempre ao nível de suas ramificações, como por exemplo, galactose, arabinose e xilose (ASPINALL, 1980). Assim, as análises das hidrólises de açúcares tanto ao nível dos cotilédones como dos tegumentos, revelaram existir polissacarídeos ácidos nas paredes celulares.

Os maiores valores obtidos nas dosagens dos açúcares ácidos em Guandu e Mucuna, confirmam os resultados obtidos pelo AT que apresentaram uma maior metacromasia para essas espécies. Do mesmo modo, confirmam os resultados obtidos com o AA a pH 1 e pH 2,5, mostrando que esses métodos são extremamente sensíveis para a detecção comparativa "in situ" de poliânions. Baseados nos resultados, pode ainda ser concluído que desses açúcares muitos já estão desprotonados a pH 1,0 o que poderia sugerir a presença de polissacarídeos sulfatados. Além disso, pelos métodos citoquímicos usados, pode ser verificado que os açúcares ácidos se distribuem de

forma heterogênea ao longo das células da paliçada em Guandu e Lab lab (ver **Tabela 1**).

No caso dos tegumentos e paredes celulares em geral, a reação do ferrocianeto poderia indicar a presença de lignina (polifenol). Os resultados obtidos demonstram que, Lab lab não apresenta qualquer deposição de compostos redutores. Em Guandu, a reação positiva é obtida na porção basal das células da paliçada, assim como uma forte reação positiva obtida em Mucuna. Isto pode indicar a presença de ácido tânico nesses locais o que confirmaria uma subestimação do material protéico nas dosagens. Resultados semelhantes foram obtidos por BEGNAMI (1991) em sementes de Senna reticulata que sugere uma reação mais positiva do ferricianeto férrico nessas sementes devido a presença de taninos que são compostos fenólicos. Essa idéia pode ser reforçada quando nos outros métodos citoquímicos utilizados foi observada a presença de corpos castanhos em grande quantidade nas porções basais da paliçada de Mucuna e menor quantidade em Guandu. LENOIR et al. (1986) mostraram que linhagens não dormentes de cevada possuem menos tanino e mais fenóis simples do que as linhagens dormentes. Outro fator que afetaria a permeabilidade, seria o estado de oxidação dos compostos fenólicos realizado pela polifenoloxidase. Tratamentos que inibem a ação dessa enzima, facilitam a entrada de água na semente. Assim, os resultados das análises citoquímicas sugerem uma testa mais dura e impermeável em Mucuna seguida de Guandu e Lab lab. Esses resultados são confirmados através das curvas de embebição. Apesar da permeabilidade detectada

em todas as espécies, *Mucuna* apresenta uma embebição nitidamente mais lenta do que as duas outras espécies.

Um dos maiores constituintes protéicos das paredes celulares são as extensinas, caracterizadas pela sequência repetitiva do pentapeptídeo Ser-(Hyp)₄. . Elas são também ricas em lisina o que lhes confere um $pI \sim 10$ (SHOWALTER, 1993). Devido o pequeno conteúdo dessas proteínas ao nível das paredes mas também devido ao fato de que a maior parte dos radicais amino da lisina interage com as substâncias pécticas (KELLER, 1993) a resposta das paredes celulares das espécies analisadas ao XP foi bastante fraca. Diversos outros materiais vegetais corados pelo XP revelaram o mesmo comportamento como o feijão jacatupé (VIDAL & PIMENTEL, 1985) e soja (CORTELAZZO & VIDAL, 1991).

A distribuição das extensinas entre as diferentes células do tegumento varia durante o desenvolvimento da semente. Não é detectada nos primeiros estágios de desenvolvimento (1-6 dias após a ântese). Nesses primeiros estágios a paliçada cessa as divisões e começa o processo de maturação. As sementes 19 dias após a ântese iniciam o acúmulo de extensinas. Esse acúmulo ocorre primeiramente nas paredes das células da paliçada e então nas células parenquimáticas e osteoesclereídeos. Após esse primeiro estágio de desenvolvimento, as células em ampulheta imaturas, vão se diferenciando, fazendo com que as paredes da região equatorial tornem-se mais espessas e retenham sua expansão, enquanto que nas extremidades há uma continuidade na expansão (HARRIS, 1984). As extensinas tornam-se mais concentradas nas células da paliçada por

volta do 21º dia após a ântese. Ela se deposita também na região do hilo (CASSAB & VARNER, 1988).

Os tegumentos representam a parte das sementes que opoem maior resistência a entrada de água como demonstrado por SHAYAKEWICH & WILLIANS (1971), em sementes de *Brassica napus*. Nas espécies em que o tegumento funciona como barreira ao fluxo de água, tratamentos de escarificação eliminam esse problema, é o caso por exemplo de *Bixa orellana* (AMARAL, 1990), *Halimium hamilifolium* (PENA *et al.*, 1988), *Rhus javanica* (WHASHITANI, 1988), *Tetrapleura tetraptera* (ODOEMENA, 1988) e *Sesbania punicea* e *S. bispinosa* (GRAAF & VAN STADEN, 1983).

No processo de embebição, o potencial mátrico assume grande importância e depende principalmente dos teores de amido, corpos protéicos e paredes celulares presentes nas células (LABOURIAU, 1983). O potencial osmótico e o potencial de pressão são os outros componentes do potencial hídrico. O primeiro, está relacionado à concentração de substâncias dissolvidas na célula enquanto que o segundo, é o resultado da força exercida pela entrada da água nas paredes celulares. Em resumo, maiores quantidades de matriz e maiores concentrações de substâncias dissolvidas, acarretam menores potenciais hídricos e conseqüentemente uma maior entrada de água. Quando isso ocorre, a pressão exercida pela água, acarreta um aumento no potencial de pressão o que diminui a sua taxa de entrada.

A embebição apresenta três fases segundo BEWLEY & BLACK (1985): a primeira, de rápida absorção e depende principalmente das condições ambientais e potencial mátrico da semente; a segunda,

onde não ocorre aumento no peso fresco pois a semente está em equilíbrio osmótico com o meio e na terceira ocorre uma absorção metabólica da água que está associada a germinação da semente (LABOURIAU, 1983; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

No caso das espécies estudadas, pode ser observada uma rápida absorção até 12 horas de embebição para Lab lab e Guandu. Inicialmente e apesar de serem espécies com testa permeável, é notada a influência dessa estrutura como barreira à entrada de água. Assim, as médias apresentam valores altos de desvio padrão. Com o passar do tempo, praticamente todas as sementes se embebem e essa variação diminui, culminando com a germinação que ocorreu a partir de 36 horas. Ainda devido a essas variações, mas também aos tempos utilizados, a 2ª e a 3ª fases descritas anteriormente não se apresentaram muito claras. Isso não impede de sugerir que elas devem ocorrer após as 24 horas iniciais que apresentam, no caso estudado, a primeira fase da embebição.

Em *Mucuna* houve um retardo na embebição quando comparada a Lab lab e Guandu e mesmo após 12 horas de imersão, a maioria das sementes não apresentou um grande aumento no seu conteúdo de água. Com isso, a fase de rápido incremento de matéria fresca foi deslocada para o período entre 12 e 24 horas mas, ainda assim, não para todas as sementes o que justificaria um grande desvio padrão para as médias obtidas após esse período. As sementes de *Mucuna* germinaram apenas após 48 a 72 horas de embebição. Esse retardo em relação às duas outras espécies estudadas poderia ser explicado pelo retardo na absorção de água que possibilitaria o desencadeamento do processo germinativo. Conseqüentemente, apesar

das 3 espécies apresentarem testa permeável, as diferenças obtidas poderiam ser explicadas pelo potencial mátrico e, neste caso, ele seria menor em Lab lab e Guandu quando comparado ao de Mucuna. Outro fator limitante seria a maior presença de taninos em Mucuna, como já discutido anteriormente.

Resultados obtidos em tegumentos de flamboyant (*Delonix regia*) (PAPP & CORTELAZZO - experimentos em andamento) mostram que seu tegumento é extremamente espesso, atingindo valores que ultrapassam 1,5 mm de espessura em sua região mais larga. Desses valores, a camada paliçádica tem $160 \pm 22 \mu\text{m}$ de espessura. Os osteoesclereídeos, em camada tripla, representam $74 \pm 31 \mu\text{m}$ e as células parenquimáticas do mesófilo, de $600 \pm 60 \mu\text{m}$ na camada mais fina e até mais de $1000 \mu\text{m}$ na região mais espessa.

Uma outra característica na camada paliçádica é a presença da "linea lucida" visualizada mesmo em cortes sem nenhum tipo de coloração (PAPP & CORTELAZZO, comunicação pessoal e ilustrada na **Figura 48**). A "linea lucida" é formada devido à diferente orientação de microfibrilas nas paredes celulares segundo SCOTT et al. (1962).

Os tegumentos das três espécies analisadas apresentaram algumas diferenças interessantes em relação ao flamboyant e mesmo a urucum (AMARAL, 1990), que são sementes de testa impermeável. A mais importante, foi a ausência de uma "linea lucida" identificável nos métodos citoquímicos utilizados. Outra diferença anatômica foi a presença de uma camada única de osteoesclereídeos ao invés de várias camadas como em flamboyant. Além disso, a camada parenquimática do mesófilo das espécies analisadas, se apresentou

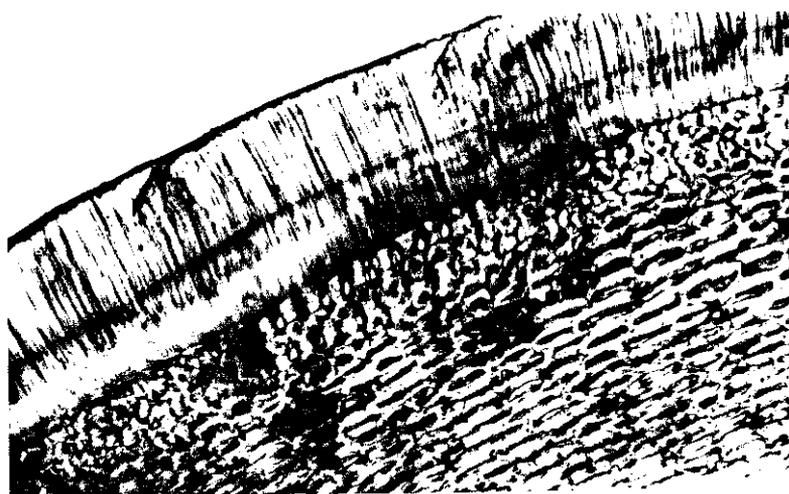


FIGURA 48: Corte de tegumento de flamboyant obtido por Papp & Cortelazzo e cedido gentilmente para ilustrar as diferenças com as espécies estudadas. Pode ser notada a camada paliçádica com a "linea lucida", uma tripla camada de osteosclereídeos e uma camada parenquimática com paredes celulares extremamente espessas. Aumento: 100 X.

menos espessa e com células cujas paredes são muito mais finas do que no caso da semente com tegumento impermeável.

Ao nível da análise dos polissacarídeos, tegumentos de flamboyant apresentam apenas cerca de 38% de polissacarídeos neutros (CORTELAZZO, comunicação pessoal), contrastando com 65% em Guandu, 57% em Lab lab e 54% em Mucuna. Em contrapartida, cerca de 25% de polissacarídeos ácidos formam o tegumento de flamboyant e esse valor, não ultrapassa os 15% nas espécies estudadas.

Finalmente flamboyant não tem mais de 6% de xilose e Guandu, que tem os mais baixos teores desse açúcar, apresentou 17%, seguido de Lab lab com 24,6% e Mucuna com 27,4%.

Assim, os resultados sugerem uma série de diferenças na composição de açúcares que deverá conduzir a experimentos futuros possibilitando o estabelecimento ou não de uma relação entre a composição de açúcares e a permeabilidade das sementes. Para reforçar essa hipótese, resultados que vem sendo obtidos por BEGNAMI & CORTELAZZO (comunicação pessoal) apontam outras diferenças a nível dos açúcares aqui discutidos para o café, que é uma espécie que apresenta sementes com testa permeável.

ANEXO

Fixação: A fixação dos tecidos para a sua observação microscópica é uma etapa extremamente importante uma vez que um fixador inadequado pode originar resultados alterados e até mesmo errôneos.

Misturas de etanol e ácido acético apresentam um bom poder fixador e de rápida penetração. A fixação se dá por aglutinação dos constituintes químicos dos tecidos. O maior inconveniente é que o ácido acético pode remover proteínas por solubilização, como é o caso por exemplo do colágeno em tecidos animais (VIDAL, 1987). Ele remove também grandes quantidades da histona H1 (MELLO & VIDAL, 1980). Assim, os materiais usados para a identificação de proteínas ou métodos de oxido-redução, não foram fixados pelo etanol:ácido acético. Do mesmo modo, o etanol solubiliza lipídios, inviabilizando o EA para a identificação do material hidrofóbico.

Aldeídos são usados para a fixação de tecidos mesmo para a microscopia eletrônica. Reagem com os grupamentos amina das proteínas formando pontes de metileno. Essas pontes formam uma rede entrecruzada desses compostos que possibilitam uma boa preservação do tecido. A penetração lenta e um inconveniente pois é necessário tempos de fixação prolongados e a frio. Para pequenas moléculas como é o caso do formaldeído, há também a necessidade de lavagens prolongadas após a fixação para remover o excesso do fixador o que nem sempre ocorre eficientemente. Reações que usam o Reativo de Schiff por exemplo e que tem afinidade por aldeídos,

podem dar resultados errôneos devidos às moléculas do fixador e não dos tecidos (PEARSE, 1961).

Diversos métodos gerais e citoquímicos de análise, após o corte dos materiais, cujos princípios gerais são os que se seguem:

Safranina e azul astra (SA) - Safranina é largamente utilizada pelos anatomistas vegetais, principalmente combinada ao verde rápido ou ao azul astra. É um corante que apresenta afinidade por paredes celulares lignificadas ou com outros componentes fenólicos, paredes cutinizadas ou suberizadas. Cora ainda outros componentes citoplasmáticos e seu modo de ação não é muito conhecido. Do mesmo modo, sabe-se que o azul astra cora paredes celulares não lignificadas (substâncias celulósicas e pécticas) além de outros componentes celulares não corados pela safranina (JOHANSEN, 1940)

Método do PAS (Periodic Ácido Schiff) - O método é baseado na oxidação dos grupos hidroxila de carbonos vicinais pelo ácido periódico. A reação se processa de forma rápida, mesmo a temperatura ambiente e, concentrações de HIO_4 em torno de 0,5% em peso, podem agir de forma eficiente formando dois grupamentos aldeídicos nas hidroxilas dos açúcares. Normalmente, o tempo utilizado varia entre 8 a 10 minutos e, se prolongado, ocorre oxidação dos aldeídos formados, originando ácido carboxílico. Obviamente, tempos extremamente curtos, não serão suficientes para oxidar todas as hidroxilas vicinais presentes também originando resposta errônea (PEARSE, 1961).

Após a oxidação, adiciona-se o reativo de Schiff. Esse reativo é preparado a partir da fucsina básica (mistura de

pararosanilina, rosanilina e magenta II) que é um corante magenta. A adição de radicais sulfito em meio ácido (pH 2-3), destrói o grupo cromofórico inicial, tornando a solução cor de palha ou até incolor segundo a qualidade do corante. Essa solução tem afinidade por radicais carbonila, aos quais as moléculas formadas se ligam de forma covalente, restabelecendo o grupo cromofórico do corante, ou seja, a cor magenta (MELLO & VIDAL, 1978; CORTELAZZO *et al.*, 1983; VIDAL, 1987). De todo o modo, é feito sempre um controle em paralelo que não é oxidado pelo ácido periódico e cujo resultado, normalmente negativo, mostra os grupos carbonila já presentes nos tecidos.

Assim, os radicais carbonila formados pela oxidação provocada pelo ácido periódico reagem e dão a cor característica do método. Ele é usado normalmente para a coloração de glicanas neutras e, no caso específico de vegetais, para a identificação de celulose e amido.

Xylidine Ponceau (XP) - É um corante ácido e que apresenta dois grupos sulfato em sua estrutura que se encontram desprotonados a partir de pH próximo a 1,0. Tem sido usado para a caracterização de cátions totais presentes nos tecidos, agindo como o verde rápido (JOHANSEN, 1940; VIDAL, 1987). A pH 2,5 as proteínas em geral encontram-se protonadas e reagem com o XP (ligações eletrostáticas), o que possibilita sua identificação "in situ". Tratamentos com enzimas proteolíticas como a tripsina e pepsina fazem com que não haja resposta positiva ao corante (CORTELAZZO & VIDAL, 1991).

Azul de Toluidina (AT) - É um corante básico que contém grupos amino, protonados até pH 12-13. A pH 4,0, a maioria das proteínas encontram-se ainda protonadas e não reagem com o AT. Entretanto, grupos fosfato dos ácidos nucleicos carboxila e sulfato de polissacarídeos ácidos podem se ligar eletrostaticamente ao corante (LISON, 1960; PEARSE, 1961).

Uma característica da coloração com o AT é a metacromasia que ocorre devido a proximidade de radicais aniônicos que se ligam ao mesmo e possibilitam uma interação entre as moléculas planares do corante, dificultando sua excitação eletrônica. Assim, maiores energias são necessárias para essa excitação e o efeito visual do fenômeno se manifesta com cores mais arroxeadas nos tecidos. Fenômeno semelhante ocorre em soluções de AT que a concentrações de 10⁻⁸M apresentam um pico de absorção a 625 nm (cor verde azulada). Com o aumento da concentração, há a formação de "dímeros", "trímeros" e pequenos "polímeros" de moléculas empilhadas de AT, fazendo com que o pico de absorção da solução diminua para valores próximos a 550-560 nm (Cor magenta), caracterizando assim um comportamento também comum a outros corantes básicos e denominado Metacromasia (VIDAL, 1987).

Azul de alcian (AA) - Corante básico de estrutura não totalmente conhecida possuidor de íon Cobre e quatro grupos tetrametilisotiurônico (SCOTT, 1970) que são os possíveis responsáveis por seu comportamento análogo ao AT. O mecanismo de ação não é bem conhecido mas é utilizado para a detecção de polissacarídeos ácidos totais quando em soluções a pH 2,5 e apenas polissacarídeos sulfatados a pH 1,0 (MELLO & VIDAL, 1980).

Sudan black (SB) - Molécula hidrofóbica normalmente utilizada em solução de etanol e que interage com as porções hidrofóbicas dos tecidos. Seu uso exige um material fixado com aldeídos ou substâncias que não solubilizam os lipídios e cortes em congelação com a utilização de solventes orgânicos no seu processamento (MAIA, 1979).

Ferricianeto férrico (FF) - A mistura de soluções recém preparadas de ferricianeto de potássio e cloreto férrico formam o ferricianeto férrico que pode oxidar nos tecidos mono e polifenóis, além de grupos pirrol, indol, ácido ascórbico e lipídios não saturados. A reação do ferricianeto férrico tem valor positivo quando é formado o azul da prússia (ferrocianeto férrico) que ocorre pela ação de redutores fortes como é o caso dos compostos acima citados. A formação do verde da prússia (ferrocianeto ferroso-férrico) pode ser causada por redutores fracos mas também ocorre espontaneamente nas soluções de ferricianeto férrico. Finalmente, pode ser formado o ferrocianeto ferroso (branco) quando há a ação de redutores extremamente fortes como tiosulfatos e outros, não facilmente encontrados em preparações histológicas e além disso, de difícil identificação dada a sua cor (LISON, 1960).

CONCLUSÕES

1. A maior reserva encontrada nos cotilédones das três espécies estudadas foi o amido. Guandu apresentou o maior conteúdo (55,5%), Lab lab (53%) e Mucuna (39,4%)
2. Comparativamente, os grãos de amido de Lab lab foram mais numerosos e em menor tamanho. Em Mucuna, apresentaram-se mais globular que nas duas outras espécies.
3. O ácido fluorídrico alterou a estrutura semi-cristalina dos grãos de amido bem como a sua sensibilidade a oxidação pelo ácido periódico e conseqüentemente a reação do PAS.
4. Proteína foi a segunda maior reserva encontrada nos cotilédones; Lab lab (25,6%), Guandu (19,1%) e Mucuna (17,4%).
5. A presença de taninos não pode ser descartada ao nível dos cotilédones de Mucuna e isso poderia afetar os resultados das dosagens protéicas feitas nessa espécie.
6. As proteínas foram evidenciadas pelo XP e se distribuem por todo o citoplasma. A coloração do material protéico também pelo PAS indicou a presença de glicoproteínas nos corpos protéicos.
7. A análise em SDS-PAGE dos extratos protéicos revelou inúmeras diferenças entre as espécies, principalmente entre Mucuna

e as outras duas. Pode ser sugerido que Guandu e Lab lab apresentam uma maior proximidade filogenética em relação a Mucuna.

8. As três espécies estudadas são pobres em lipídios, apresentando valores menores que 2% em relação a matéria seca dos cotilédones.

9. As três espécies contêm entre 2 a 3% de açúcares livres. Guandu e Mucuna, em torno de 6% de polissacarídeos solúveis em água, e esse valor foi menor que a metade em Lab lab.

10. Os tegumentos apresentam anatomicamente uma estrutura típica. Na paliçada, pode se detectada a celulose como principal componente das paredes, pois elas foram muito coradas pelo método do PAS e as análises cromatográficas revelaram um grande conteúdo de glicose.

11. Os tegumentos das três espécies são ricos em xilose e arabinose. Assim, um xiloglicano e um arabinano fazem parte da composição das paredes celulares da testa.

12. Mucuna e Guandu apresentam uma maior quantidade de polissacarídeos ácidos em seus tegumentos. Em Guandu, são mais abundantes os polissacarídeos ácidos já desprotonados em pH 1,0 na porção apical da paliçada e ocorre o contrário em Mucuna

13. As curvas de embebição mostraram que Guandu e Lab lab embebem mais rapidamente. Os dados obtidos aliados aos resultados citoquímicos, sugerem uma testa mais dura e impermeável em Mucunado que para as outras duas espécies. Pode ser sugerido que o ácido tânico tem, nesse caso, um importante papel no retardamento da embebição das sementes de Mucuna.

14. Guandu, Lab lab e Mucuna apresentam os osteoesclereídeos em forma de ampulheta, característica de leguminosas. Essas células são maiores em Mucuna, seguindo-se Lab lab.

RESUMO

No presente trabalho, foram estudadas três espécies leguminosas: *Cajanus cajan*, *Lab lab purpureum* e *Mucuna aterrima* que pertencem a sub-família Papilionoidae onde se concentram a maioria dos legumes utilizados na alimentação humana. Guandu, Lab lab e Mucuna também são utilizados em forragem e como adubo verde. Pelas análises citoquímicas e bioquímicas foi constatada a presença de duas principais reservas nos cotilédones dessas espécies: amido e proteína. O conteúdo de amido é maior em Guandu com 55,5%, seguido de Lab lab com 53% e Mucuna com 40%, sempre em relação a matéria seca (MS). Os métodos citoquímicos e a microscopia de polarização mostraram que os grãos de amido em Lab lab são mais numerosos e apresentam menor tamanho. O material protéico está homogeneamente distribuído ao redor dos grãos de amido, por todo o citoplasma das células. Lab lab foi a espécie com maior conteúdo protéico, com cerca de 25,6% da MS. A análise dos extratos protéicos em SDS-PAGE, revelou inúmeras e muitas diferenças entre as espécies. Guandu apresentou uma proteína característica de 100 KDa e Mucuna pode ser caracterizada pelas proteínas com massa molecular aparente de 36,5, 27,5 e 18,5 KDa. A proteína de 45 KDa foi mais proeminente em Lab lab. Os lipídios e açúcares livres estão presentes em pequenas quantidades nestas sementes. Através dos cortes citoquímicos e microscopia eletrônica de varredura foi constatado uma estrutura tegumentar típica, com uma camada paliçádica espessa e com células bastante alongadas. A paliçada apresentou-se metacromática quando corada com AT pH 4,0. devido a

presença de substâncias pécticas. Também houve forte coloração com PAS devido à presença de celulose. Nenhuma das espécies apresentou a "Linea Lucida" nas células da testa, característica de sementes impermeáveis à água. A análise cromatográfica revelou um grande conteúdo de glicose, xilose e arabinose nos tegumentos da três espécies. No tegumento de Mucuna, foi detectada a presença de corpos marrons que se tratam possivelmente de taninos. Os dados obtidos na curva de embebição mostraram que Guandu e Lab lab embebem mais rapidamente. Mucuna embebeu mais lentamente e, embora também seja uma espécie com tegumento permeável pode-se aferir que se trata da testa que apresenta maior resistência à entrada de água. Desse modo pode ser sugerido que essa maior resistência seja devida à presença de taninos, que apareceram apenas nessa espécie. Os resultados obtidos foram ainda confrontados com aqueles encontrados em espécies totalmente impermeáveis, cuja anatomia dos tegumentos apresenta inúmeras diferenças com relação as três espécies estudadas.

SUMMARY

In the present work, three leguminous species have been studied: *Cajanus cajan*, *Lab lab purpureum* and *Mucuna aterrima* which belong to the sub-family Papilionoideae where are concentrated the most of the legumes used in the human nutrition. Guandu, *Lab lab* e *Mucuna* are also used in foragement and as green fertilizer. Citochemical and biochemical analysis have been made and it was found out the presence of two principal reserves in the cotyledons of these species: starch and protein. The content of followed by *Lab lab* with the dry material(DM). The citochemical methods and the polarization microscopy indicate that the starch grains in *Lab lab* are more numerous and presents a smaller size. The proteic material presented homogeneously distributed around the starch grains, in all the cytoplasm of the cells. *Lab lab* was the specie with the major proteic content, with about 25,6% of the DM. The proteic extracts analysis in SDS-PAGE revealed innumerable proteins and too much differences between the species. The Guandu presented a characteristic protein of 100 KDa and *Mucuna* may be characterized by the proteins of smaller molecular weight, like 36,5, 27,5 and 18,5 KDa. The 45 KDa protein was exclusive for *Lab lab*. The lipids and free simpler carbohydrates are in low amount in this seeds. Though the citochemical cuts and electronic microscopy of sweeping, it was verified one typical tegumentar structure, with a dense layer of palisade and with cells quite elongated. The palisade became metachromatic when colored with AT pH 4,0, due to the presence of pectic substances. Also there were a strong coloration

of the PAS due to the presence of celulosys. None of the species showed the "Linea Lucida" in the cells of the testa, characteristic of water impermeable seeds. The cromografic analisys revealed a great glucose, xylose and arabinose content in the teguments of these three species. In the Mucuna tegument, the presence of brown corps, possibly taninns, was detected. The data obtained in the embibement curve show that Guandu and Lab lab embibes faster. Mucuna embibed more slowly, and although it is also a permeable tegument specie, one can verify that it the testa that presents the major resistence to water entrance. So, it may be sugested that this major resitence is due to the presence of tannins, wich were present in great quantity only in this specie. The obtained results were still confronted with those finded in totaly impermeable species, whose tegument anatomy presents inumerable diferences in relation with the three studied species.

BIBLIOGRAFIA

- AMABLE, R.A. & OBENDORF, R.L. 1986. Soyben seed respiration during simulatec preharvest deterioration. **J.Exp.Bot.**, 37: 1364-75.
- AMARAL, L.I.V. 1990. Germinação e dormência em sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana* L.: Aspéctos Fisiológicos e estruturais. Tese de Mestrado.Unicamp. 122pp.
- ANELLI, G. ; NUTI, M. P. 1978. Chemical characteristics of seed of some legumes cultivated in Somalia. **Rev. Agric. Trop. Subtrop.**, 71:101-7.
- ARORA, S.K. & DAS, B. 1976. Cowpea as potencial crop for starch. **Straeke**, 28: 158-60.
- ASPINALL, G.O. 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: Preiss, J. ed. **Carbohydrates: Structure and function**. v.3. London. Academic Press. p.473-500.
- BAILEY, C.J. & BOULTER, D. 1972. The structure of bicilin of *Vicia faba*. **Phytochemistry**, 11: 59-64.
- BANKS, W. & MUIR, D.D. 1980. Structure and chemistry of the starch granule. In: Preiss, J. ed. **Carbohydrates: Structure and function**. v.3. London. Academic Press. p. 321-329.
- BEGNAMI, C.N. 1991. Alterações celulares durante o envelhecimento em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. e *Senna reticulata* (Willdenow) Irwin & Barnaby. Tese de Mestrado. Unicamp. 118pp.
- BEVILACQUA, L.B.; FOSSATI, F. & DONDERO, G. 1987. "Callose" in the impermeable seed coat of *Sesbania punicea*. **Ann. Bot.**, 59:335-41.

- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1982. *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. V.2. Viability, dormancy and environmental control.* Berlin Springer Verlag. 375pp.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1985. *Seeds. Physiology of development and germination.* New York. Plenum Press. 367pp.
- BLUMENKRANTS, N. & ASBOE-HANSEN, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *An. Biochem.*, **54**: 484-9.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, **72**: 248-54.
- BROCKLEHURST, P.A. & EVERS, A.D. 1977. The size distribution of starch granules in endosperm of different sized kernels of the wheat cultivar Maris Huntsman. *J.Sci.Food Agric.*, **28**: 1084-9.
- BROCKLEHURST, P.A.; MOSS, J.P. & WILLIAMS, W. 1978. Effects of irradiance and water supply on grain development in wheat. *Ann.Appl.Biol.*, **90**: 265-76.
- CAKMAK, I.; STRBAC, D. & MARSCHNER, H. 1993. Activities of Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes in Germinating Wheat Seeds. *J.Exptl.Bot.*, **44**: 127-32
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, **3**: 1-30.
- CASSAB I.G. & VARNER J.E. 1988. Cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **39**: 321-53.

- CATSIMPOOLAS, N.; CAMPBELL, T.G. & MEYER, E. W. 1968.
Immunochemical study of changes in reserve proteins of
germinating soybeans seeds. **Plants Physiol.**, **43**:799-805.
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. 1983. Basic fuchsin
and the Schiff-aldehyde reaction. I. Spectral absorption
characteristics in solution. **Acta Histochem.**, **73**: 121-33.
- CORTELAZZO, A.L. 1989. Caracterização topoquímica e bioquímica de
sementes de *Canavalia ensiformis* DC e *Canavalia gladiata* DC.
Tese de doutorado. Unicamp. 134pp.
- CORTELAZZO, A.L. 1992. Detecção e quantificação do amido em
cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o
desenvolvimento inicial da planta. **Revta.Bras.Bot.**, **15**: 157-62.
- CORTELAZZO, A.L. & VIDAL, B.C. 1989. Determination of the apparent
isoelectric point of the protein bodies of *Glycine max*.
Cytologia, **54**: 635-9.
- CORTELAZZO, A.L. & VIDAL, B.C. 1991. Soybean seed proteins:
detection in situ and mobilization during germination. **Revta.**
Bras.Bot., **14**: 27-34.
- CUTTER, E.G. 1978. **Plant anatomy: experiment and interpretation.**
Part.2. London Edward Arnold. 343pp.
- DANIELSON, C.E. 1949. Seed globulins of the Gramineae and
Leguminosae. **Biochim. J.** **44**: 387-400.
- DEKA, R. K. & SARKAR C.R. 1990. Nutrient composition and
Antinutritional Factors of *Dolichos lab lab* L. seeds. **Food**
Chemistry **38**: 239-246.

- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. & BOULTER, D. 1976. Legumin and Vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**. **15**: 3-24.
- DRIOUICH, A.; FAYE, L. & STAEHRLIN, A. 1993. The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. **TIBS**, **18**: 210-4.
- DURIGAN, J.F. 1985. Estudos da toxidez, composição e valor nutritivo das proteínas de cultivares brasileiros de feijão. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Agrícola. UNICAMP.
- EGLEY, G.H.; PAUL Jr., R.N. & LAX, A.R. 1986. Seed coat imposed dormancy histochemistry of the region controlling onset of water entry into *Sida spinosa* seeds. **Physiol. Plant**. **67**: 320-7.
- FAO/WHO. 1973. **Necessidade de energia y proteínas**. 118p. (FAO) Nutrition Meetings Reports Series 52, and WHO Technical Reports Series. 522.
- FERGUSON, J.M.; TEKRONY, D.M. & EGLI, D.B. 1990. Changes during early soybean seed and axes deterioration: I. Seed quality and mitochondrial respiration. **Crop Sci**. **30**: 175-9.
- FRY, S.C. 1988. The structure and Function of Xyloglycan. **J. Exptl. Bot.**, **40**: 1-11.
- FRY, S.C. 1992. Xyloglucan: A Metabolically Dynamic Polysaccharide. **Trends Glycosci. Glycotechnol.**, **4**: 279-89.
- GENTINETTA, E. & SALAMINI, F. 1979. Free sugar fraction of the amylose-related mutants of maize. **Biochem. Genet.**, **17**: 405-14.
- GONZALEZ, A.; RODRIGUEZ, R. & TAMES, R.S. 1993. Rooting in relation to ethylene, peroxidase and polyphenol oxidases in hazelnut shoots. **Plant Physiol. Biochem.**, **31**: 411-20.

- GRAAF, J.L. & VAN STADEN, J. 1983. The effect of different chemical and physical treatments on seed coat structure and seed germination of *Sesbania* species. **Z.Pflanzenphysiol.**, **112**: 221-30.
- HAISSIG, B.E. & DICKSON, R.E. 1979. Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. **Physiol.Plant.**, **47**: 151-7.
- HALMER, P. 1985. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. **Physiol. Veg.**, **23**: 107-25.
- HARRIS, W.M. 1984. On the Development of osteosclereids in seed coats of *Pisum sativum* L. **New Phitol.** **98**: 135-41.
- HARRIS, W.M. 1987. Comparative ultrastructure of development seed coats of "hard-seeded" and "soft-seeded" varieties of soyben *Glycine max* (L.) Merr. **Bot.Gaz.**, **148**: 324-31
- JENNER, C.F. 1982. Storage of Starch. In: Loewus, F.A. & Tanner, W. ed. **Plant Carbohydrates I**. Berlin. Springer Verlag. p. 700-747.
- JENNER, C.F. & RATHJEN A.J. 1978. Physiological basis of genetic differences in the growth of grains of six varieties of wheat. **Austr. J. Plant Physiol.**, **5**: 249-62.
- JENNINGS, A.C. & MORTON, R.K. 1963. Changes in carbohydrate, protein and non-protein nitrogenous compounds of developing wheat grain. **Austr.J.Biol.Sci.**, **16**: 318-31.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York. McGaw. 523pp.
- JOSELEAU, J.P. & CHAMBAT, G. 1984. Structure of the primary cell walls of suspension-culture *Rosa glauca* cells. II. Multiple forms of xiloglucans. **Plant Physiology.**, **74**:694-700.

- JOSELEAU, J.P.; CARTIER, N.; CHAMBAT, G.; FAIK, A. & RUEL, K. 1992. Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. **Biochimie**, **74**: 81-8.
- KELLER, B. 1993. Structural cell wall proteins. **Plant Physiol.**, **101**: 1127-30.
- KERBY, K. & SOMERVILLE, S.C. 1992. Purification of an Infection-related Extracellular Peroxidase from Barley. **Plant Physiol.**, **100**: 397-402.
- KIERNAN, J. A. 1981. **Histological & Histochemical methods: theory and practice**. London, Persamon, 344p.
- KREIS, M. & DOLL, H. 1980. Starch and prolamin level in single and double high-lysine barley mutants. **Physiol.Plant.**, **48**: 139-43.
- LABOURIAU, L.G. 1983. **A germinação das sementes**. Washington. Organização dos Estados Americanos. 174pp.
- LAM-SANCHES, A. 1977. Variabilidade genética y ambiental en el contenido de proteína y aminoácidos em leguminosas. **Ach. Latioam. Nutr.**, **27**: 118-24.
- LARKINS, B.A. 1981. Seed storage proteins: Characterization and Biosynthesis. In: Larkins, B.A., ed. **The biochemistry of Plants**. v.6. New York, Academic, p.449-489.
- LENOIR, C.; CORBINEAU, F. & COME, D. 1986. Barley (*Hordeum vulgare*) seed dormancy as related to glumella characteristics. **Physiol.Plant.**, **68**: 301-7.
- LI, Z-C; MCLURE, J.W. & HAGERMAN, H. 1989. Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase, β -D-glucosidase, malato dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in Barley (*Hordeum*

- vulgare* L.) and Oat (*Avena sativa*) primary leaves. **Plant Physiol.**, **90**: 185-90.
- LILLIE, R. D. 1954. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. New York, Blakiston.
- LISON, L. 1960. **Histochimie et cytochimie animales**. Paris. Gauthier-Villars. 607pp.
- LOVANDINI, L.A.C. et al. 1972. Emprego de *Dolichos lab lab* (L.) como adubo verde. Estudo do plantio intercalado na cultura do milho. **Bragantia** **5**:97-108.
- MAIA, V. 1979. **Técnica Histológica**. 2a.ed. São Paulo. Atheneu. 246.pp.
- MAYER, A. M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1989. **The germination of seeds**. Oxford, Pergamon. 211 pp.
- MCCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V. & OWENS, H. S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. **Anal Chem.** **22**: 1156-8.
- MCLESTER, R.C.; HALL, T.C.; SUN, S.M. & BLISS, F.A. 1973. Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. **Phytochemistry**, **12**: 85-93.
- MEIER, H. & REID, J.S.G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: Loewus, F.A. & Tanner, W. ed. **Plant Carbohydrates** I. Berlin. Springer-Verlag. p.418-471.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. 1978. A reação de Feulgen. **Ciênc. Cult.**, **30**: 665-76.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. 1980. **Práticas de Biologia Celular**. São Paulo, Edgar Blucher-Funcamp. 1980. 69 p.

- MENEGARIO, A., 1966. **As leguminosas forrageiras**. Campinas, DATE, Boletim Técnico. 49p.
- MOORE, P.J.; SWORDS, K.M.M.; LYNCH, M.A. & STAEHELIN, L.A. 1991. Spatial organization of the Assembly Pathways of Glycoproteins and Complex Polysaccharides in the Golgi Apparatus of Plants. **J.Cell Biol.**, **112**: 589-602.
- MURRAY, D.R. 1984. Accumulation of seed Reserves of Nitrogen. In: Murray, D.R. ed., **Seed Physiology**, v.1. Sydney, Academic. p.83-127
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS) 1979. **Tropical Legumes**. Resources of the future. Whashington, 331p.
- ODOEMENA, C.S. 1988. Breaking of seed coat dormancy in a medicinal plant *Tetrapleura tetraptera* (Schum & Thonn). **J.Agric.Sci.**, **111**: 393-4.
- OSBORNE, D.J. 1983. Senescence in seeds. In: Thimann, K. V. ed. CRC Series in Aging: **Senescence in Plants**. Boca Raton, CRC Press. pp. 13-38.
- OSBORNE, T.B. 1924. **The vegetable proteins**. London, Longman Green, 321p.
- OYENUGA, V.A. 1980. Tables of representative values of foods commonly used in tropical countries. **Medical Research council Special Report Series n°302**, p10.
- PATE, J.S. 1975. Pea. In: **Crop Physiology**. Evans, L.T., ed. Cambridge, Univ. Press. p.191-224.
- PEARSE, A.G.E. 1961. **Histochemistry: Theoretical and applied**. London, J. & A. Churchil Ltd., 2ª ed. 998 p.

- PENA, J.; APARICIO-TEJO, P. & SANCHEZ-DIAZ, M. 1988. Dormancy mechanism and the effect of scarification in the germination of *Halimium halimifolium* seeds. **J.Plant Physiol.**, **132**: 54-8.
- PERNOLLET, J.C. 1978. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. **Phytochemistry**, **17**: 1473-80.
- PERNOLLET, J.C. 1982. Les corpuscules proteiques des graines, stade transitoire de vacuoles specialisees. **Physiol.Veg.**, **20**: 259-76.
- PERNOLLET, J.C. 1985. Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds. **Physiol. Veg.**, **23**: 45-59.
- PUNTARULO, S. & BOVERIS, A. 1990. Effects of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soubean embryonic axes. **Plant Sci.**, **68**: 27-32.
- REEVES, R.G. & VALLE, C.C. 1932. Anatomy and microchemistry of the cotton seed. **Bot.Gaz.**, **93**: 259-77.
- ROBERTS, E.H. 1972. Storage environment and the control of viability. In: Roberts E.H. ed. **Viability of Seeds**. London. Chapman and Hall. p.14-58.
- ROLFE, B.G. & GRESSHOFF, P.M. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. **Ann.Rev.Plant Physiol.Mol.Biol.**, **39**: 297-319.
- ROLSTON, M.P. 1978. Water impermeable seed dormancy. **Bot.Rev.****44**: 365-96.
- RUEL, K. & JOSELEAU, J.P. 1993. Modifications of xyloglucans distribution within the walls of *Rubus fruticosus* cultured cells during a growth cycle. **Acta Bot.Neerl.**, in press.

- SCOTT, J.E. 1970. Histochemistry of alcian blue. I. Metachromasia of alcian blue, astrablau and other cationic phtalocyanin dyes. **Histochimie**, 21: 277-85.
- SCOTT J.R., T.A. & MELVIN, E.H. 1953. Determination of dextran with anthrone. **Anal. Chem.**, 25: 1656-61.
- SCOTT, F.M.; BYSTROM, B.G. & BOWLER, E. 1962. *Cercidium floridum* seed coat, light and electron microscopic study. **Am.J.Bot.**, 49: 821-33.
- SHAYAKEWICH, C.F. & WILLIAMS, J. 1971. Resistance to water absorption in germinating rapessed (*Brassica napus* L.). **J.Exp.Bot.**, 70: 19-24.
- SHOWALTER, A.M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. **Plant Cell**, 5: 9-23.
- SGARBIERI, V.C. 1980. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família leguminosae. **Ciência e Cultura**, 32: 78-84, Janeiro,10.
- SINGH, R. & JULIANO, B.O. 1977. Free sugars in relation to starch accumulation in developping rice grain. **Plant Physiol.**, 59: 417-21.
- SMITH, D.L. 1973. Nucleic acid, protein, and starch synthesis in developing cotyledons of *Pisum arvense* L. **Ann.Bot.**, 37: 795-804.
- SOUZA, P.A. 1987. Avaliação bromatológica, nutricional e tecnológica de algumas leguminosas tropicais. São Paulo, USP, 85p Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

- SOUZA, P.A. de; SOUZA H.B.A. de; SANTOS J.E. & O.de FREITAS. 1991. Avaliação Físico Química e Nutricioinal de grãos de Feijão Guandu (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp). **Alim.Nutr.**, 3: 51-62.
- SOUZA, P.A. de . 1992. Avaliação Fisicoquímica e Nutricional de grãos de Lab lab (*Lab lab purpureum* (L.) Sweet). **Alim. Nutr.**, 4: 99-109.
- TAL, M. SILBERSTEIN, A. & NUSSER, E. 1986. Why does coomassie brilliant blue R interact differentily with different proteins? **J.Biol.Chem.**, 260: 9976-80.
- TEIXEIRA, J. P. F.; SPOLADORE, D. S.; BRAGA, N. R. & BULISANI, E. 1985. A. Composição química de grãos de Feijão-Guandu, cultivar Kaki. **Bragantia, Campinas**, 44 (1): 457-463.
- TOMBS, M.P. 1967. Protein bodies of the soybean. **Plant Physiol.**, 42: 797-813.
- TOOLE, E. H.; S.B. HENDRICKS, H.A. BORTHWICK, & V. K. TOOLE. 1956. Physiology of seed germination. **Ann. Rev. Plant Physiology**. 7: 299-324.
- TRIVEDI, B.S.; BAGCHI, G.D. & BAJPAI, U. 1979 Scanning electron microscopic studies on spermoderm of some Mimosideae (Leguminosae). **Phytomorphology**, 29: 211-8.
- TURNER, J.F. 1969. Physiology of pea fruits. VI. Changes in uridine disphosphate glucose pyrophosphorylase and adenosine diphosphate glucane phosphorylase in the developing seed. **Austr.J.Biol.Sci.**, 22: 1145-51.
- TZAI, C-Y & NELSON, O.E. 1966. Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. **Science**, 151: 341-3.

- ULIAN, E.C. 1981. Caracterização agronômica, avaliação bromatológica e valor nutritivo de sementes de leguminosas utilizadas como adubos verdes. Jaboticabal, UNESP, 52p. (Trabalho de graduação).
- VALENTI, G.S.; MODENESI, P. ROTI-MICHELLOZZI, G. & BEVILACQUA, L.R. 1986. Structural and histochemical characters of the *Prosopis tamarugo* Phil. Seed coat in relation to its hardness. **Acta Bot.Neerl.**, 35: 475-87.
- VAN ONCKELEN, H.A.; CAUBERGS, R. & DE GREEF, J.A. 1977. Effect of light treatment and endogenous growth hormones on amylase activities in cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Cell Physiology.**, 18: 1029-40.
- VIDAL, B.C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2 R. **Ann. Histochem.**, 15: 289-96.
- VIDAL, B. C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification. **Cell. Mol. Biol.**, 22: 45-64.
- VIDAL, B.C. 1987. **Métodos em Biologia Celular**. In: Vidal, B.C. & Mello, M.L.S. ed. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro. Atheneu. p.5-39.
- VIDAL, B.C. & PIMENTEL, E.R. 1985. Caracterização bioquímica, topográfica e estrutural dos corpos protéicos do feijão macuco ou jacatupé (*Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng). **Revta.bras.Bot.**, 8: 223-9.
- VILLERS, T.A. 1983. Ultrastructural Changes in Seeds Dormancy and Senescence. In: Thimann, K.V. ed. CRC Series in Aging: **Senescence in Plants**. Boca Raton, CRC Press. pp 38-66.

- WHASHITANI, I. 1988. Effects of high temperatures on the permeability and germinability of the hard seeds of *Rhus javanica* L. **Ann.Bot.**, **62**: 13-6.
- YAZOLI-SAMADI, B.; RINNE, R.W. & SEIF, R.D. 1977. Componentes of developing soybean seeds: oil, protein, sugars, starch, organic acids, and amino acids. **Agron.J.**, **69**: 481-6.
- ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; SIERAKOWSKI, M.R.; CORREA, J.B.C. & REICHER, F. 1992. A linear (1-5)-linked α -L-arabinofuranan from the seeds of guapuruvu (*Schizolobium parahybum*). **Carbohydr.Res.**, **233**: 265-9.
- ZHANG, G.F. & STAEHELIN, A. 1992. Functional Compartmentation of the Golgi Apparatus of Plant Cells. **Plant Physiol.**, **99**: 1070-83.
- ZINGALES, B. 1984. Analysis of protein by sodium dodecyl-sulfate-polyacrilamide gel electroforesis. In: Morel, C.M. ed. **Genes and antigens of parasites**. Rio de Janeiro, UND/World Bank/WHO/Fiocruz, 357-363.